

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Neurologia

### **Ependimomas. Valor do cálculo do índice proliferativo na sua diferenciação**

Joana Isabel Monteiro Serafim

---

**Junho 2017**

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Neurologia

### **Ependimomas. Valor do cálculo do índice proliferativo na sua diferenciação**

Joana Isabel Monteiro Serafim

**Orientado por:**

Professor Doutor José Guilherme de Brito Cortez Pimentel

---

**Junho 2017**



## RESUMO

**Introdução:** Os ependimomas são tumores raros, de etiologia incerta, com origem nas células da neuroglia (as quais supostamente revestem o tubo neural no início da vida embrionária e, mais tarde, os ventrículos e o canal medular). De entre os seus subtipos, destacam-se os ependimomas clássicos (grau II OMS) e os anaplásicos (grau III OMS). Apesar da fixação de critérios de diagnóstico por parte da OMS, a distinção histológica entre ambos mantém-se subjectiva, havendo necessidade de estabelecer critérios objectivos que garantam tal distinção.

**Objectivos:** O objectivo principal do estudo foi a fixação de um valor de corte entre ependimomas clássicos e anaplásicos, baseado no cálculo do índice proliferativo (IP). Como objectivo secundário, foram analisadas as possíveis associações entre o IP e as variáveis “diagnóstico histológico” (ou grau de anaplasia), “idade”, “sexo” e “localização tumoral”.

**Materiais e Métodos:** Foi realizado um estudo retrospectivo com uma amostra de 74 doentes diagnosticados com ependimoma. Quarenta e oito casos tinham sido classificados como ependimomas clássicos, e 26 como anaplásicos. As amostras teciduais foram alvo de marcação imunohistoquímica com o anticorpo Ki-67 (MIB-1) e posteriormente analisadas para obtenção do IP. Para a fixação do valor de corte, foi construída uma curva ROC para cada grau de anaplasia. Para a análise da possível relação entre o IP e as restantes variáveis, foram efectuados os testes estatísticos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

**Resultados:** Foi obtido o valor de corte de 1,45% (com sensibilidade de 100% e especificidade de 95,8%) entre os IP dos dois tipos de ependimomas. Registaram-se ainda diferenças estatisticamente significativas entre os IP no que respeita ao diagnóstico histológico, à idade (quando dividida nas faixas pediátrica e adulta) e às localizações infra-tentorial e espinhal ( $p < 0,05$ ); verificou-se o oposto relativamente ao sexo e à localização supra-tentorial ( $p > 0,05$ ).

**Discussão e Conclusão:** O valor de corte estabelecido revelou sensibilidade e especificidade bastante satisfatórias. Verificou-se uma relação entre IP mais elevados e maior anaplasia, menor idade e localização infra-tentorial, e entre IP mais reduzidos e localização espinhal. Serão necessários estudos adicionais, com amostras de maior dimensão, no sentido de validar o conhecimento adquirido e de expandi-lo em novas direcções.

**Palavras-chave:** ependimoma, índice proliferativo (Ki-67), imunohistoquímica.

O Trabalho Final exprime a opinião da autora e não da FMUL.

## ***ABSTRACT***

***Introduction:*** Ependymomas are rare tumours of uncertain etiology that derive from neuroglial cells (these supposedly cover the neural tube at the beginning of embryonic life and later on the ventricles and central canal). Among its subtypes, classic ependymomas (grade II WHO) and anaplastic ependymomas (grade III WHO) should be emphasized. In spite of the determination of diagnostic criteria by the WHO, the histological distinction between them is still subjective. There is, therefore, the need to establish objective criteria that can guarantee such distinction.

***Objectives:*** The main objective of the study was the establishment of a cut-off value between classic and anaplastic ependymomas, based on the calculation of the proliferative index (PI). As a secondary objective, the possible connections between the PI and variables “histological diagnosis” (or degree of anaplasia), “age”, “sex” and “tumor location” were analysed.

***Materials and Methods:*** A retrospective study based on a sample of 74 patients diagnosed with ependymoma was conducted. Forty-eight cases had been classified as classic ependymoma, and 26 as anaplastic. The tissue samples were immunohistochemically labeled with the Ki-67 (MIB-1) antibody and their PI was subsequently obtained. In order to establish a cut-off value, two ROC curves were built (one for each degree of anaplasia). The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis statistical tests were used to analyse a possible connection between the PI and the other variables.

***Results:*** A cut-off value of 1,45% (with 100% sensitivity and 95,8% specificity) between the PIs of the two types of ependymomas was obtained. Statistically significant differences were found between PIs concerning histological diagnosis, age (when divided into pediatric and adult groups) and infratentorial and spinal locations ( $p<0,05$ ); the opposite was observed concerning sex and supratentorial location ( $p>0,05$ ).

***Discussion and Conclusion:*** The established cut-off value showed quite satisfactory sensitivity and specificity. A connection between higher PIs and higher anaplasia, younger age and infratentorial location was found, as well as between lower PIs and spinal location. Further studies will be necessary, preferably with larger samples, in order to validate the acquired knowledge and to expand it in new directions.

**Keywords:** ependymoma, proliferative index (Ki-67), immunohistochemistry.

## ÍNDICE

<b>Lista de abreviaturas</b>	7
<b>Introdução</b>	8
<b>Objectivos</b>	26
<b>Materiais e Métodos</b>	27
<b>Resultados</b>	30
<b>Discussão</b>	41
<b>Conclusão</b>	43
<b>Agradecimentos</b>	45
<b>Bibliografia</b>	46
<b>Anexo A (Lista de reagentes)</b>	51
<b>Anexo B (Lista de índices proliferativos)</b>	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

BSA – Albumina sérica bovina

CDKIs – Inibidores CDK

CDKs – Cinases dependentes de ciclinas

CHLN – Centro Hospitalar de Lisboa Norte

DAB – 3,3'-Diaminobenzidina

EMA – *Epithelial membrane antigen*

GFAP – *Glial fibrillary acidic protein*

HSM – Hospital de Santa Maria

IP – Índice(s) proliferativo(s)

LCR – Líquido céfalo-raquidiano

LN – Laboratório de Neuropatologia

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão fosfato alcalino

PI – *Proliferative index*

pKi67 – Proteína Ki-67

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

ROC - *Receiver Operating Characteristic*

SNC – Sistema Nervoso Central

WHO – *World Health Organization*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 EPÊNDIMA: CONCEITO E ORIGEM

As células do sistema nervoso central (SNC) dividem-se em dois tipos principais: os **neurónios**, células especializadas responsáveis pelo processamento e transmissão de impulsos nervosos, e a **neuroglia**, que exerce funções de suporte mecânico e metabólico dos neurónios [1]. A neuroglia, por sua vez, divide-se em quatro subtipos: **oligodendrócitos**, que contribuem para a formação dos feixes de mielina do SNC; **astrócitos**, células altamente ramificadas que são intermediárias nas trocas metabólicas entre os neurónios e a corrente sanguínea, tendo também funções de armazenamento de glicogénio e reparação do SNC; **microglia**, o equivalente do sistema monócito-macrofágico ao nível do SNC; e **células endodimárias**, que revestem as cavidades ventriculares e o canal medular e que constituem o epêndima [1,2,3]. Estas células, por sua vez, são subdivididas em [Figura 1]:

- **endodimócitos**, células cubóides ou cilíndricas baixas que se agregam fortemente umas às outras através de complexos juncionais epiteliais, originando uma camada única e ininterrupta que se ramifica na zona basal e que ostenta cílios e microvilosidades na zona apical [1,4,5]; são responsáveis pelo movimento e absorção do líquido céfalo-raquidiano (LCR) [2,3,6];

- **tanícitos**, presentes apenas no III ventrículo [2,3] e caracterizados por monocílios [7] e longos processos basais que ligam os capilares ao hipotálamo; transportam substâncias do LCR até ao sistema porta-hipofisário [2,3];

- **células epiteliais coroideias**, existentes na superfície dos plexos coroideus, destacando-se pelas pregas que possuem lateralmente e também nas bases; encarregam-se da secreção de LCR [2,3,5,7].

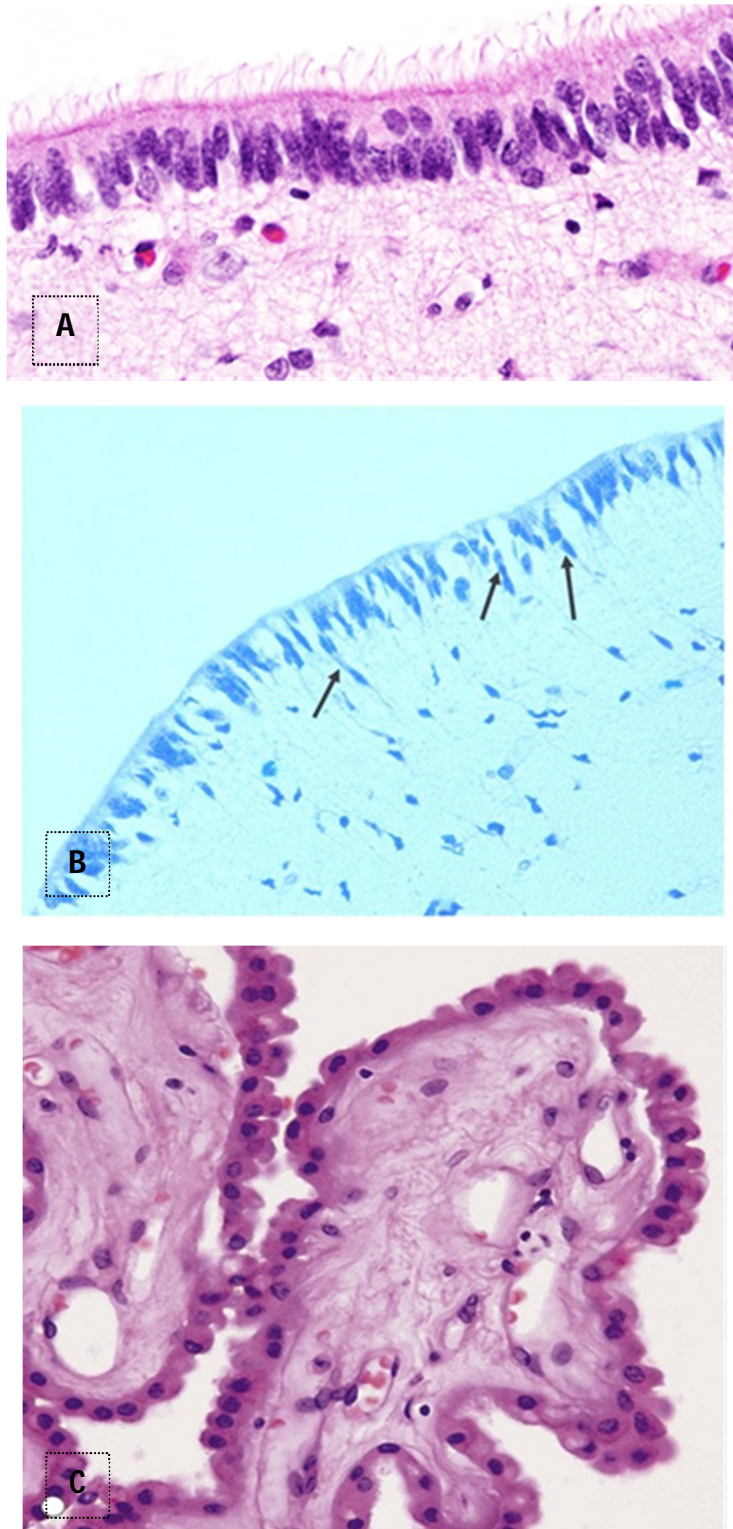


Figura 1 – Células endimárias. A - Endimócitos; os seus cílios projectam-se, neste caso, no III ventrículo. B - Tanicitos (assinalados por setas). C - Plexo corioideu com células epiteliais corioideias.

[Fontes: A - adaptado de <https://medschool.ucsf.edu/>. B - adaptado de Lavezzi, A.M., Corna, M.F., and Matturri, L. (2010). Ependymal alterations in sudden intrauterine unexplained death and sudden infant death syndrome: possible primary consequence of prenatal exposure to cigarette smoking. *Neural Dev* 5, 17. C - adaptado de <https://basicmedicalkey.com/>.]

Têm sido discutidas na literatura outras possíveis funções do epêndima para além das acima mencionadas, tais como o transporte e filtração de moléculas, o isolamento do tecido nervoso em relação a substâncias nocivas circulantes no LCR, o movimento de restos celulares pelo trajecto do LCR, a dispersão de mensageiros neuronais no LCR e ainda a função de barreira imunológica [4,6,7]. Contudo, o conhecimento sobre o propósito deste tipo de células permanece limitado [8].

O epêndima tem uma origem algo semelhante à dos outros tecidos do SNC. No final da segunda semana após a fertilização, o embrião encontra-se dividido numa camada superior (epiblasto) e noutra inferior (hipoblasto) [9]. A **gastrulação** inicia-se pouco depois, dividindo o embrião em ectoderme, mesoderme e endoderme [9] [Figura 2].

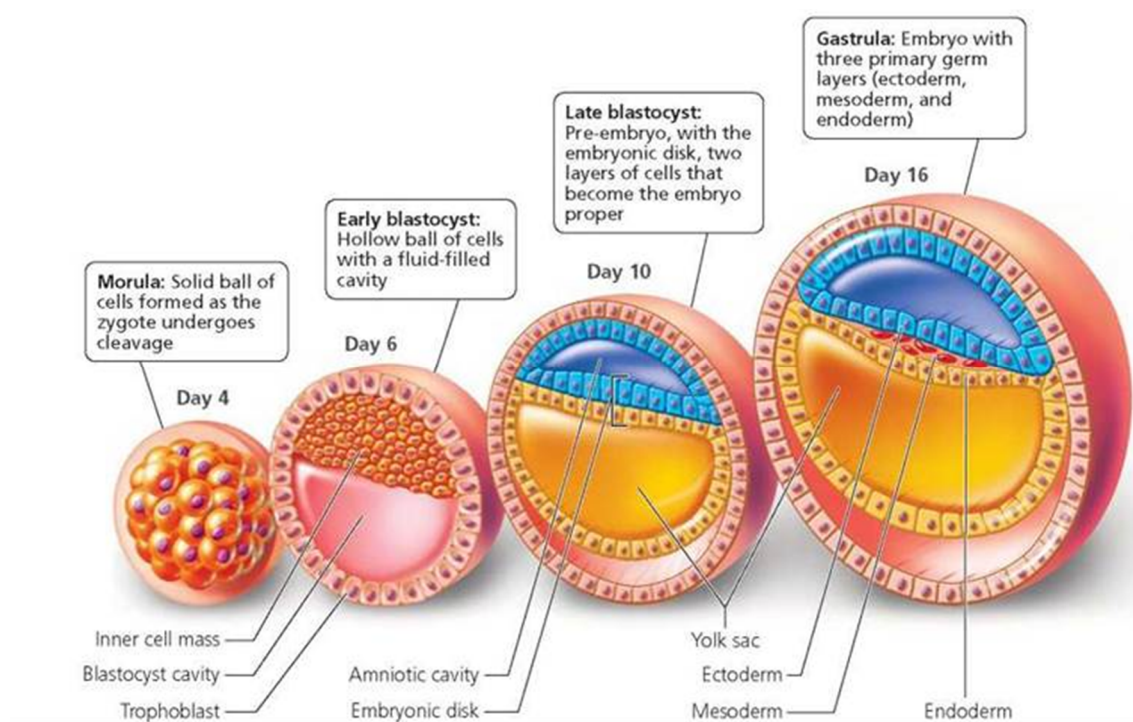


Figura 2 – Embriogénese humana (fases mais precoces após a fertilização). [Fonte: adaptado de <http://schoolbag.info/>.]

As células da ectoderme originam, entre outras estruturas, a **placa neural** – processo apelidado de **neurulação** [9]. Os bordos da placa neural elevam-se e fundem-se, formando o **tubo neural** [7,9] [Figura 3]. A maioria das estruturas relativas ao encéfalo e à medula espinhal advém do processo descrito, havendo adicionalmente uma



**neurulação secundária** responsável pela formação de uma pequena porção da medula espinhal, com base nas células da mesoderme [9].

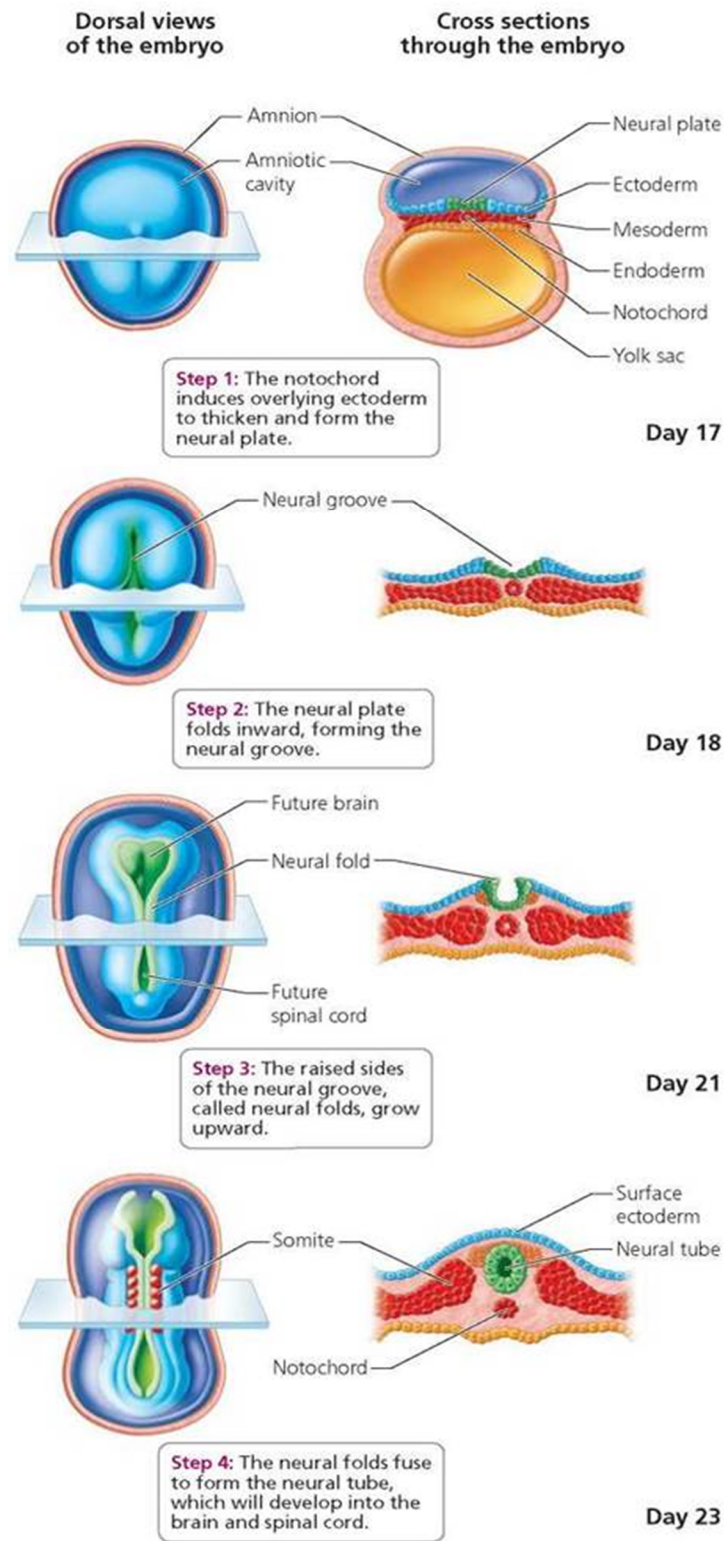


Figura 3 – Formação do SNC a partir da ectoderme. [Fonte: adaptado de <http://schoolbag.info/>.]

A parede do tubo neural é constituída pelo **neuroepitélio indiferenciado primitivo**, um conjunto de células epiteliais pseudo-estratificadas que são as precursoras de todas as células do SNC, incluindo as células endoteliais [2,3,6,7]. Como resultado das múltiplas mitoses do neuroepitélio, surgem as **células da glia radial** (células estaminais neurais multipotentes) [6,7] e posteriormente os **neuroblastos** (que formarão neurónios) e também os vários tipos de **células da neuroglia** (encontrando-se aqui incluído o epêndima) [2,3].

As células do epêndima surgem, sobretudo, entre o 14º e o 18º dias de desenvolvimento embrionário [4,8] e ainda entre o 8º e 15º dias pós-natais [8]. A divisão destas células apenas sucede durante o desenvolvimento do SNC, não existindo no adulto [4,6].

## 1.2 O CICLO CELULAR E O CANCRO

O ciclo celular visa a duplicação do material genético presente nos cromossomas da célula e a sua distribuição por duas células-filhas idênticas [10,11]. Consiste em quatro fases: **G1**, **S**, **G2** e **M** [12,13,14]. As fases G1, S e G2 constituem a **interfase** e a fase M comporta a **mitose** e a **citocinese** [10] [Figura 4].

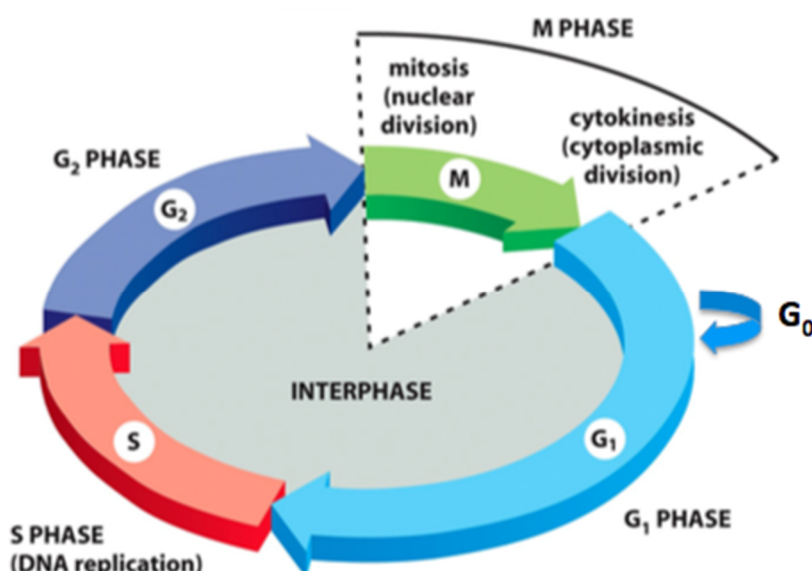


Figura 4 – Representação esquemática da interfase (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M) e da fase M (mitose e citocinese).  
[Fonte: Alberts, B. et al. The Cell Division Cycle. In: Alberts, B. et al. Essential Cell Biology. 3rd Ed. New York: Garland Science; 2010; 18:609-648.]

A **interfase** é um intervalo entre duas fases M, sendo nestas que se processa a divisão celular [15]. Na fase G1 a célula inicia o seu crescimento, reunindo as condições para a replicação de ácido desoxirribonucleico (ADN) que ocorrerá em S [15]. Em G2 há novo crescimento, preparando a célula para a fase mitótica [15]. A célula pode, no entanto, passar de G1 para **G0**, permanecendo quiescente e sem se dividir, fenómeno que pode ser reversível ou irreversível [14,15]. Neste último caso, as células deixam de se dividir de forma permanente, atingindo uma diferenciação terminal ou um estado de senescência [14,15].

A **mitose** equivale à divisão nuclear da célula e inclui, por sua vez, as seguintes fases [Figura 5]:

- Profase – início da formação do fuso mitótico e da condensação dos cromossomas no núcleo [16];
- Prometáfase – dissociação do invólucro nuclear [16];
- Metafase - posicionamento dos cromossomas na região equatorial da célula, ligados ao fuso mitótico [16];
- Anáfase – separação de cromátídeos-irmãos e sua movimentação, por acção do fuso mitótico, em direcção aos pólos da célula [16,17];
- Telófase – formação do invólucro nuclear em volta de cada conjunto de cromátídeos segregados, dando origem a duas células-filhas geneticamente idênticas [16,17].

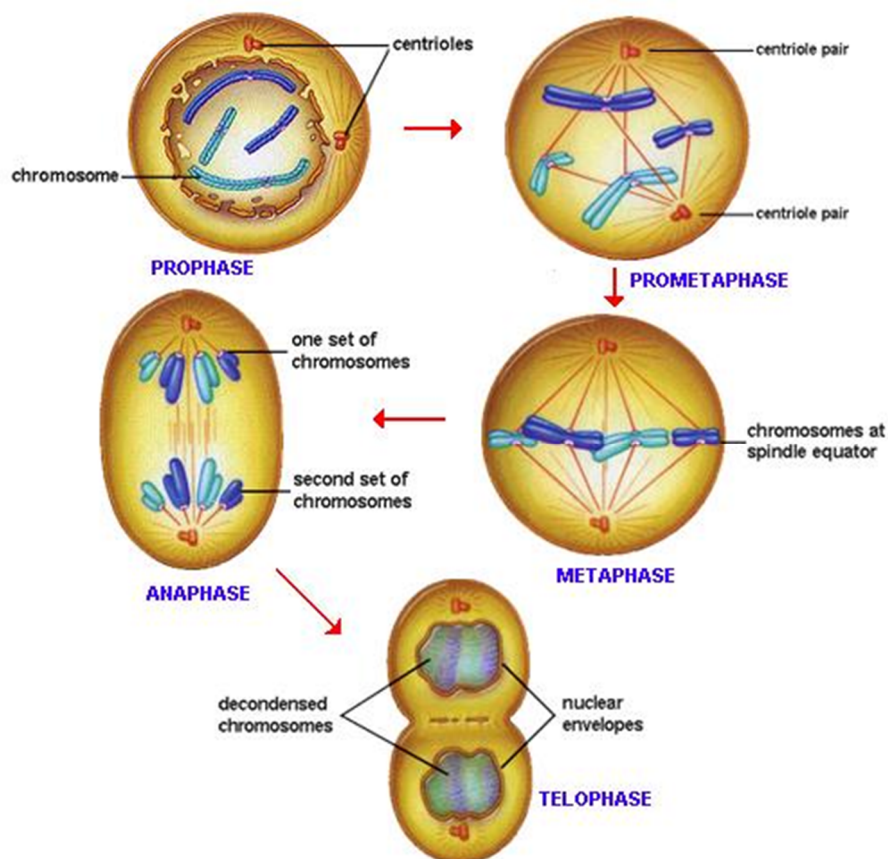


Figura 5 – As várias fases da mitose: profase, prometafase, metafase, anafase e telofase. [Fonte: adaptado de <http://biology.tutorvista.com/>.]

A **citocinese** é a divisão do citoplasma, destacando-se o aparecimento de um anel contráctil de actina e miosina que faz a separação definitiva das duas células-filhas [10].

A passagem pelas várias fases do ciclo celular relaciona-se com as **cinases dependentes de ciclinas (CDKs)**, uma família de proteínas cinases de serina/treonina que requerem a activação por ciclinas [11,12,15]. Quando activadas, as CDKs fosforilam outras proteínas, iniciando uma cascata de processos que fazem avançar o ciclo celular [15]. Contrariamente aos níveis das CDKs, os níveis das ciclinas registam alterações significativas durante o ciclo, activando periodicamente as CDKs [15]. A degradação de ciclinas em proteossomas, iniciada por ubiquitinas em certos pontos do ciclo, é também um importante mecanismo de controlo da actividade dos complexos ciclina/CDK [11,18].

As ciclinas D1, D2 e D3 activam CDK4 e CDK6 e propiciam a **entrada em G1** [12,14,15]. A ciclina E associa-se com CDK2, possibilitando o **trânsito de G1 para S** [12,14,15]. O complexo ciclina A-CDK2 promove a **progressão em S** [15]. O

complexo ciclina B-CDK1 é responsável pela **progressão por G2** [14]. A ciclina A associa-se a CDK1, causando a **entrada em M** [15]. O complexo ciclina B-CDK1 controla a **progressão na fase M** [15]. As ciclinas são depois degradadas pelo complexo promotor da anafase (APC/C), o que provoca a **saída de M e reentrada em G1** [12].

Os mecanismos de controlo do ciclo celular existem para assegurar que todos os eventos respeitam uma dada sequência e que uma fase esteja completa antes de a seguinte ter lugar [10]. Neste âmbito, são essenciais os chamados *checkpoints*, que controlam a progressão da célula dentro de uma mesma fase e de uma fase para outra [14]. Existem *checkpoints* em **G1**, **G2** e **M** [Figura 6] que certificam respectivamente se:

- o ambiente é favorável à proliferação celular,
- o ADN se encontra todo replicado e sem erros, e
- os cromossomas estão correctamente aderentes ao fuso mitótico.

[10,15]

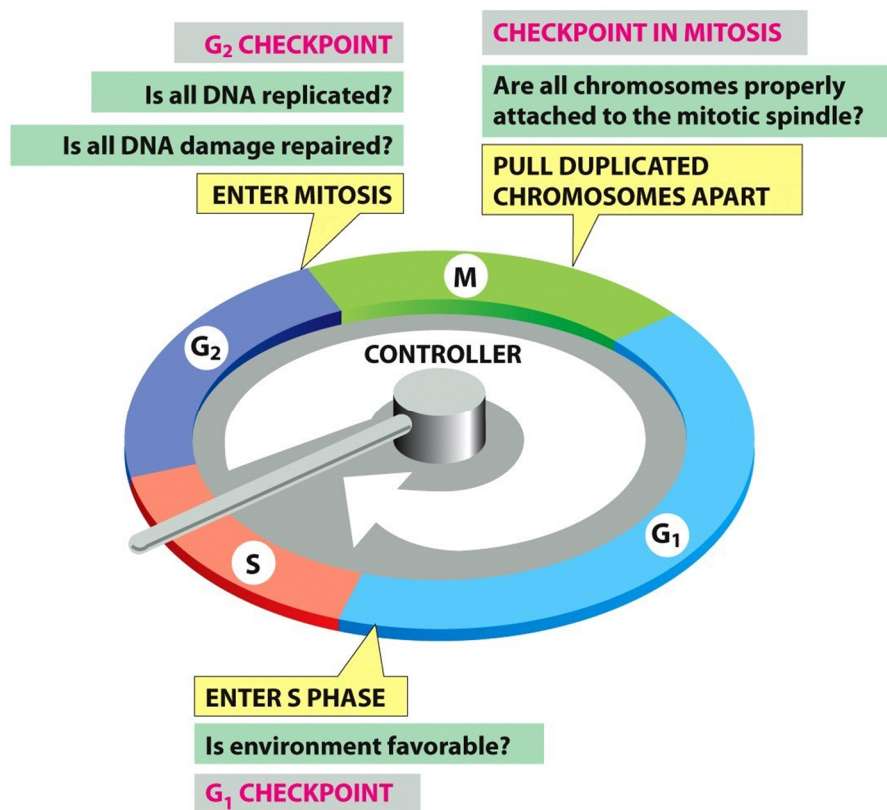


Figura 6 – *Checkpoints* do ciclo celular em G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e M. [Fonte: Alberts, B. et al. The Cell Division Cycle. In: Alberts, B. et al. Essential Cell Biology. 3rd Ed. New York: Garland Science; 2010; 18:609-648.]

Em caso de detecção de “problemas” (por exemplo, presença de danos no ADN ou falhas no alinhamento dos cromossomas), é transmitido um sinal dos *checkpoints* para proteínas efectoras - como os inibidores CDK (CDKIs) – e o ciclo celular é, então, interrompido de forma reversível [14,15]. A proteína p53 tem aqui um papel fundamental, activando a reparação de ADN e desencadeando a apoptose caso os danos de ADN sejam irreparáveis [15]. Vale a pena destacar o **checkpoint de G1 ou ponto de restrição R**. Este é um ponto de não retorno: se a célula passar por ele, compromete-se a dividir-se e já não necessitará de factores de crescimento extracelulares [10,15]. Caso tal não suceda, a célula poderá permanecer em G1 ou entrar em G0. A fosforilação da proteína do gene supressor do retinoblastoma (pRb) pelos complexos ciclina D-CDK4 e D-CDK6 é essencial para haver passagem pelo ponto de restrição [12,15].

Os tumores do SNC, à semelhança de outras neoplasias, são produto de uma divisão celular excessiva e/ou falha na diferenciação celular [12]. O que distingue as neoplasias malignas de outros tipos de neoplasia é o facto de existir uma invasão e colonização dos tecidos circundantes, podendo também haver a formação de tumores secundários (metástases) noutros locais do corpo [19]. O não funcionamento dos *checkpoints*, a instabilidade genómica (anomalias cromossómicas) e o surgimento de mutações em proto-oncogenes, genes supressores de tumores e proteínas de regulação do ciclo celular favorecem o surgimento de neoplasias malignas ou oncogénese [14,15,18]. Não é, pois, surpreendente que entre as proteínas afectadas por essas mutações estejam pRb, p53, CDKs, ciclinas e CDKIs [15].

### 1.3 GLIOMAS

Os ependimomas inserem-se num grupo mais vasto de tumores do SNC, os **gliomas**, tumores com origem em precursores das células gliais [20,21]. Constituem o tipo mais frequente de tumor primitivo do SNC [21,22,23], mas são neoplasias raras por si só [20]. São extraordinariamente heterogéneos, tanto clínica como histologicamente [22,23]. A maioria dos gliomas é composta por tumores que infiltram difusamente o parênquima circundante – os gliomas difusos [20,23]. Segundo a classificação dos

Tumores do SNC da Organização Mundial de Saúde (OMS), de 2016, os gliomas dividem-se em:

- **difusos** (astrocitomas difusos de baixo grau e anaplásicos, glioblastomas, oligoastrocitomas e oligodendrogliomas);
- **outros astrocitomas** (como o astrocitoma pilocítico);
- **ependimomas**;
- **outros gliomas** (por exemplo, o glioma cordóide do III ventrículo);
- **tumores neuronais-gliais mistos** (entre os quais se contam os gangliogliomas).

[23]

### 1.3.1 EPENDIMOMAS

#### ➤ **Classificação**

Os ependimomas [Figura 7] derivam de células da glia radial, células gliais subependimárias, células ependimárias ou precursoras destas [23]. Entre as suas características gerais contam-se a presença de cílios e microvilosidades, núcleos com cromatina “manchada”, complexos juncionais entre as superfícies laterais das células, a imunoreactividade para o EMA (*epithelial membrane antigen*) e - de forma variável – para a GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) [23,24]. Subdividem-se em:

- **Subependimomas (grau I OMS)** – muito comuns em doentes de meia-idade e idosos. São bem delimitados e de crescimento lento, de localização intraventricular, e, microscopicamente, revelam aglomerados de núcleos monomórficos numa densa matriz fibrilar eosinofílica com poucas células. As mitoses são poucas ou inexistentes.
- **Ependimomas mixopapilares (grau I OMS)** – localizam-se quase sempre na medula espinhal lombo-sagrada. Têm uma aparência histológica papilar, com células cubóides dispostas de forma radial, e um estroma mucóide basofílico. A actividade mitótica é reduzida ou mesmo nula.

- **Ependimomas clássicos (grau II OMS)** [Figuras 8 e 9] – são bem circunscritos e apresentam celularidade variável, baixa actividade proliferativa, elevado rácio núcleo/citoplasma e pseudo-rosetas perivasculares (imunoreactivas para a GFAP). As rosetas verdadeiras com lúmen próprio podem ou não estar presentes. As células são monomórficas cubóides ou colunares. Podem existir áreas de necrose. Raramente invadem o parênquima adjacente. A classificação da OMS divide-os em papilares, de células claras e tanicíticos.
- **Ependimomas anaplásicos (grau III OMS)** [Figuras 8 e 9] – possuem muitas semelhanças com os ependimomas clássicos, mas distinguem-se por densidade celular e contagem mitótica elevadas, rácio núcleo/citoplasma também elevado, pleomorfismo celular e nuclear, áreas de necrose em pseudo-paliçada e proliferação microvascular. À semelhança dos ependimomas clássicos, os anaplásicos dividem-se em papilares, de células claras e tanicíticos.

[23,25]



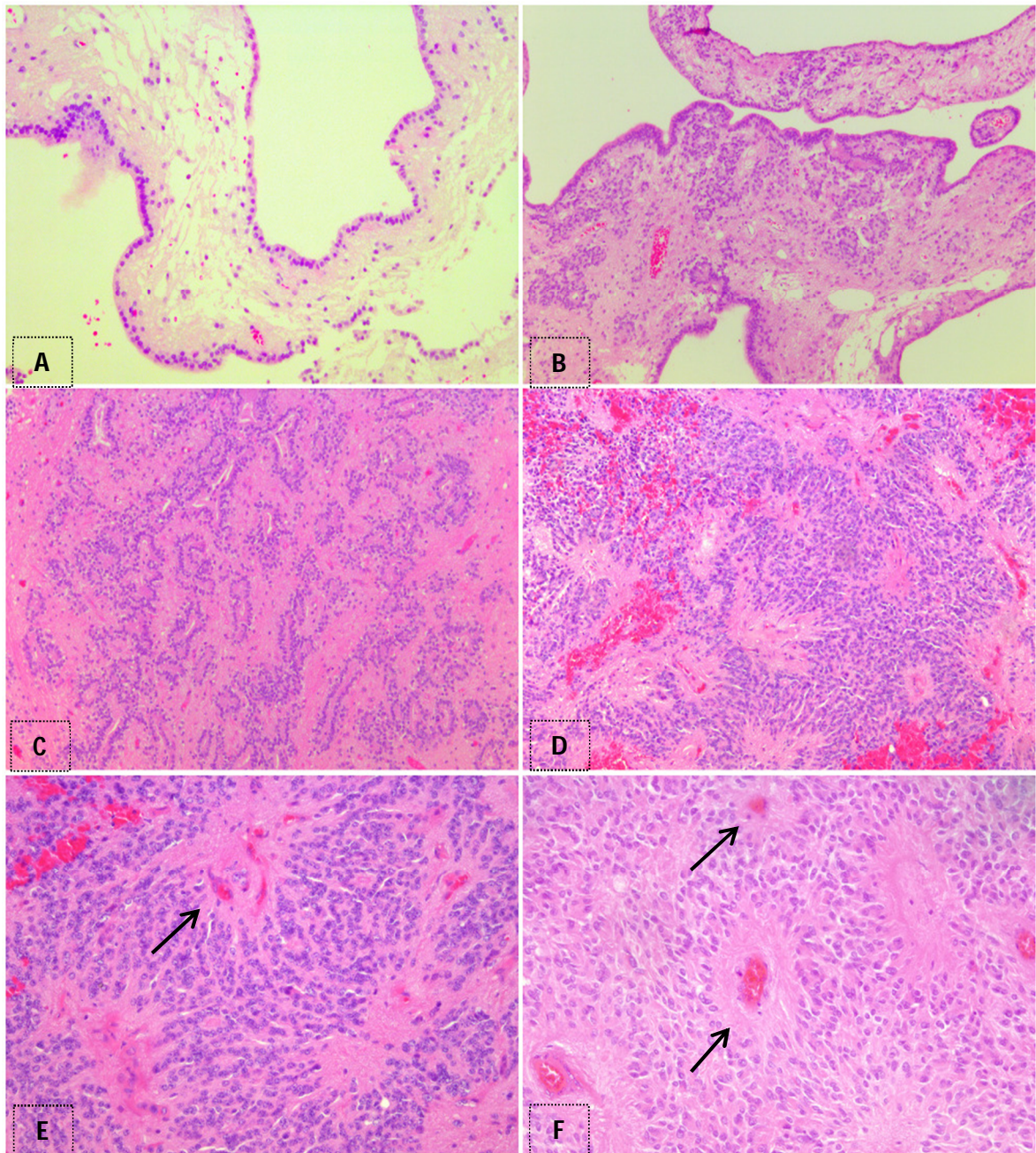


Figura 7 – Ependimomas clássicos (grau II). É notória a presença de pseudo-rosetas perivasculars (assinaladas por setas), achados histológicos típicos deste tipo de tumores. (HE 5x (B), 10x (A, C e D), 20x (E e F)) [Fonte: fotografias dos casos em estudo a partir de lâminas disponíveis no Laboratório de Neuropatologia do HSM-CHLN.]



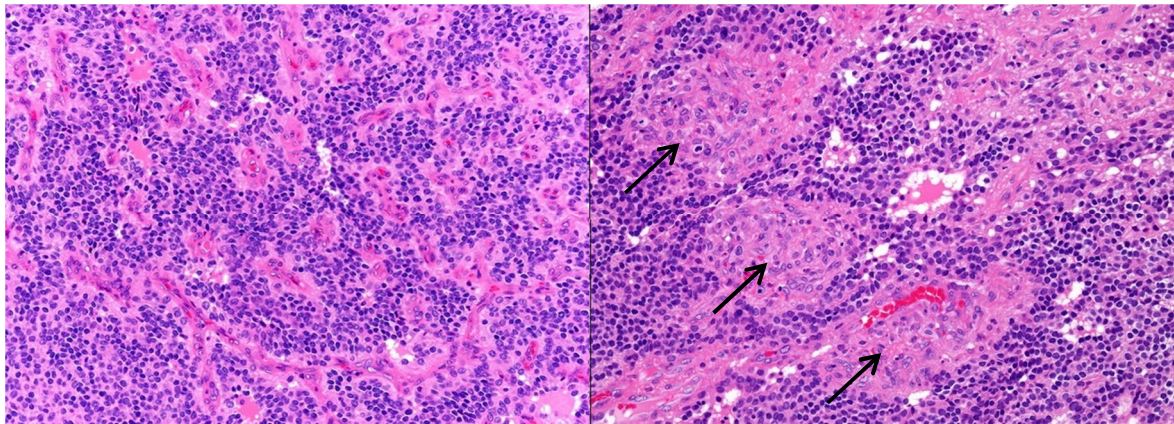


Figura 8 – Ependimomas de graus II (à esquerda) e III (à direita). À direita é visível a proliferação da microvascularização tumoral (assinalada por setas). (HE 10x) [Fonte: adaptado de <http://www.webpathology.com>.]

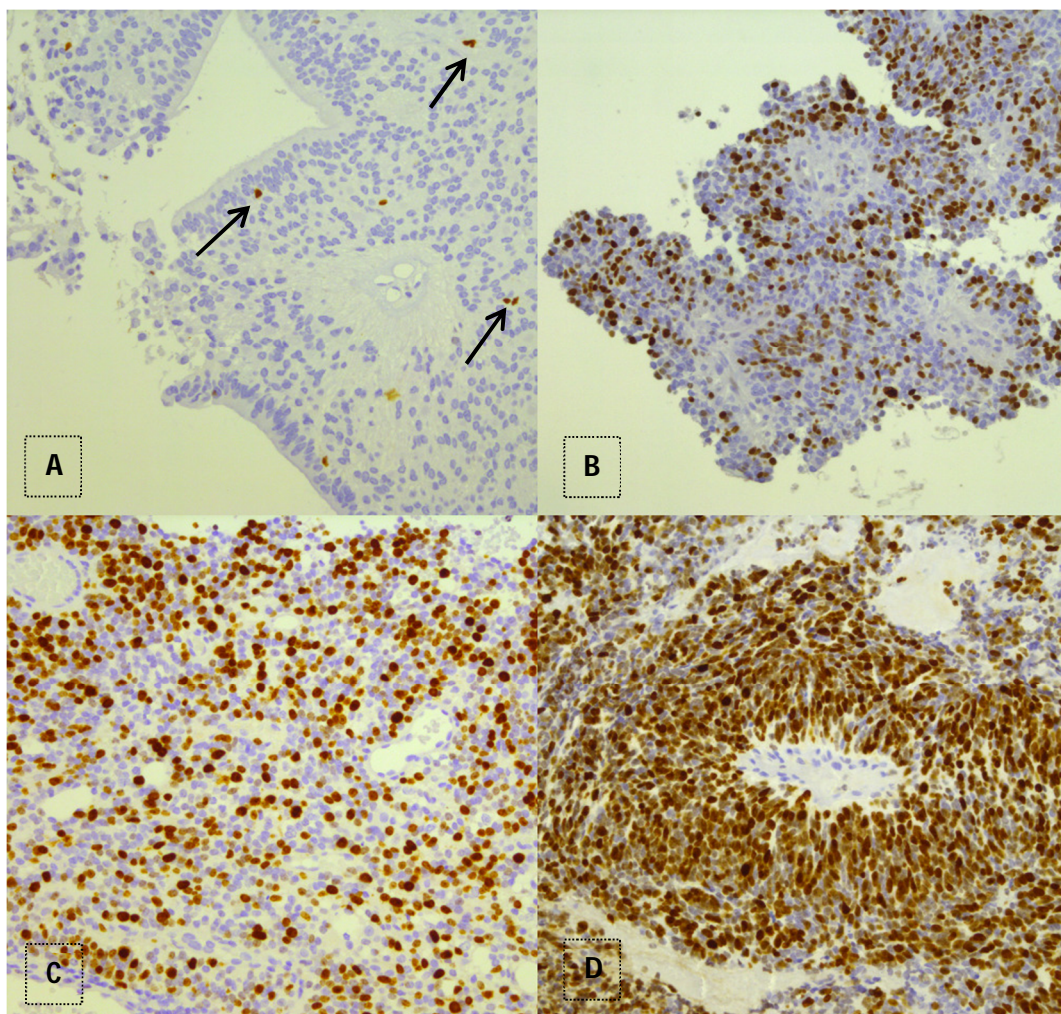


Figura 9 – Ependimomas marcados com anticorpo Ki-67. A imagem A mostra um ependimoma de grau II, com raras células em proliferação (de cor castanha, assinaladas por setas). Nas imagens B, C e D observam-se ependimomas de grau III, com um número muito significativo de células em proliferação. (Ac.Ki-67 10x) [Fonte: fotografias dos casos em estudo a partir de lâminas disponíveis no Laboratório de Neuropatologia do HSM-CHLN.]

### ➤ **Epidemiologia**

Os ependimomas são tumores raros. Todos os anos são diagnosticados cerca de 500 casos na União Europeia, sendo a incidência anual na Europa de aproximadamente 2 casos por milhão [26]. Constituem 3-5% dos gliomas intracranianos adultos e 10-12% dos tumores intracranianos pediátricos [27]. Têm uma distribuição bimodal, atingindo um pico dos 0 aos 4 anos e dos 55 aos 59 anos [27]. No entanto, todas as faixas etárias podem ser atingidas [26]. Os tumores supra-tentoriais e espinhais afectam mais os adultos e os infra-tentoriais, ou da fossa posterior, são mais comuns nas crianças [24,27,28]. O sexo masculino é mais afectado que o feminino [26,27].

### ➤ **Etiologia**

A etiologia dos ependimomas é ainda incerta. Tem sido, contudo, reportada uma maior incidência do tumor em doentes com Neurofibromatose tipo 2, anomalias no cromossoma 22 e sobre-expressão do gene *mdm2* [26].

### ➤ **Localização**

A localização mais frequente dos ependimomas é infra-tentorial (sobretudo no IV ventrículo), seguida da medula espinhal, ventrículos laterais e III ventrículo [26].

### ➤ **Diagnóstico**

Os ependimomas podem ser assintomáticos e descobertos apenas incidentalmente em autópsias [25]. Quando diagnosticados em vida, os sinais e sintomas são inespecíficos e dependem do seu tamanho e localização [26]. Segundo um estudo efectuado por Armstrong *et al.*, a dor - sob forma de cefaleia ou algia na coluna vertebral - é o sintoma mais frequente [Tabela 1] [28]. Entre outros possíveis sintomas contam-se as alterações sensitivas, do estado mental e da coordenação [Tabela 1] [28].

Presenting symptoms	All	Brain	Spine
Range	0–13	1–7	1–13
Mean/median	4/4	4/4	4/3
Most common		Pain (70%) Mental status (50%) Coordination (45%) Nausea/vomiting (30%) Vision (30%) Seizures (15%) Weakness (13%) Sensory (12%) Emotional (13%)	Pain (85%) Sensory (70%) Weakness (30%) Bladder (25%) Bowel (11%) Sexual (4%)
Mean time to diagnosis		3.5 months	8 months
Range		1–18 months	2–38 months

Tabela 1 – Lista de sintomas reportados no âmbito de um estudo efectuado no *M. D. Anderson Cancer Center* (Universidade do Texas), entre 1990 e 2007, a partir de uma amostra de 123 doentes com diagnóstico de ependimoma [28].

A marcha diagnóstica deve ser iniciada com uma história clínica e exame físico detalhados, seguidos de uma ressonância magnética nuclear (RMN) cefálica e/ou medular, na qual se observa uma lesão bem circunscrita que poderá ter um componente quístico, hemorrágico ou cálcico [26,27]. Seguem-se a exploração cirúrgica e o diagnóstico histopatológico, ou em material de biópsia ou na peça removida [26]. É de destacar que a citologia do líquido céfalo-raquidiano (LCR) se afigura como necessária para fins de estadiamento [26].

### ➤ **Tratamento**

O tratamento-padrão consiste na cirurgia, devendo a ressecção ser tão completa quanto possível [26,27]. A radioterapia pós-operatória poderá ser recomendada, dependendo de cada caso [26]. A quimioterapia é considerada ineficaz [27].

### ➤ **Prognóstico**

Os principais factores prognósticos são o grau de anaplasia do tumor, a sua localização anatómica (e consequente resectabilidade) e a idade do doente. Os tumores de graus I e II crescem lentamente e raramente metastizam [26]. Pelo contrário, os de grau III crescem mais rapidamente e são ocasionalmente invasivos, sobretudo através do LCR

[26]. Os endimomas supra-tentoriais associam-se a uma maior sobrevida do que os da fossa posterior, assim como os medulares em relação aos intracranianos [25]. Quanto mais novo o doente, pior o prognóstico, sobretudo no que respeita à faixa etária pediátrica [26].

## **1.4 PROTEÍNA Ki-67**

### **➤ Generalidades**

A proteína Ki-67 (pKi67) corresponde a um antígeno identificado em 1983 a partir do anticorpo monoclonal Ki-67, por sua vez gerado pela imunização de ratinhos com núcleos de uma linha celular de linfomas Hodgkin [29]. A importância deste anticorpo assenta no facto de, através da técnica de imunohistoquímica, poder detectar a maior parte das células existentes no ciclo celular. No entanto, o original tinha uma importante limitação prática: apenas podia ser utilizado em amostras de tecido fresco ou congelado, porque, se fosse sujeito a fixação, a imunocoloração obtida pela técnica de imunohistoquímica ficava reduzida ou desaparecia [30]. Por consequência, acabou por ser substituído por outros anticorpos – como o MIB-1 - que conseguem actuar em amostras fixadas e sujeitas a irradiação por microondas [30].

A proteína é codificada pelo gene MKI67 [31] e possui duas isoformas com massas moleculares diferentes - 320 e 359 kD –, sendo uma proteína de tamanho considerável [29,30]. Tem uma semi-vida de 60 a 90 minutos [30]. A sua quantidade é altamente regulada durante o ciclo celular, estando esta proteína sujeita a fosforilação, desfosforilação e degradação por proteases [30]. Está apenas presente nas células em proliferação, tanto normais como tumorais; durante toda a interfase localiza-se no núcleo e na mitose encontra-se sobretudo à superfície dos cromossomas, não existindo durante G0 [29,32]. É, consequentemente, útil como marcador de proliferação celular, relacionando-se com a fracção de crescimento de um conjunto de células [29,32]. O facto de não haver uma homologia entre pKi67 e outras proteínas - com a excepção de equivalentes noutros mamíferos – contribui para que a sua função seja ainda considerada incerta [29,30]. Suspeita-se, contudo, que esteja envolvida na progressão do ciclo celular [29], mais especificamente agindo como uma espécie de surfactante que



impede que os cromossomas se aglomerem numa massa única de cromatina após a desintegração do envelope nuclear na prometáfase [31].

A importância de pKi67 e do respectivo anticorpo no âmbito das neoplasias deve ser destacada. Através da técnica de imunohistoquímica, o anticorpo pode ser usado para avaliar a fracção de crescimento de uma dada população de células. Surge nesse sentido o **índice proliferativo Ki-67** (IP), expresso pela percentagem ou fracção de células tumorais imunopositivas para Ki-67 em relação ao número total de células tumorais [24,29]. Este índice desempenha um papel fundamental no diagnóstico histopatológico de tumores, sobretudo linfomas [30,32]. Tem também um importante valor prognóstico na progressão, recidiva e sobrevida da doença, especialmente nas neoplasias da próstata e da mama [29,30].

#### ➤ **A proteína Ki-67 nos ependimomas**

No que toca aos tumores do SNC, e especificamente aos ependimomas, os estudos centrados no anticorpo Ki-67 ainda deixam uma considerável margem de incerteza.

A recente meta-análise de Chen *et al.* (2015) afirmou a possibilidade de a sobre-expressão de Ki-67 ser um factor preditivo de mau prognóstico em doentes com gliomas [33]. Contudo, esta investigação baseia-se em estudos demasiado díspares entre si, dado que estes se debruçaram sobre diversos tipos de gliomas. Para além disso, apenas um desses estudos se centrava exclusivamente em ependimomas clássicos (grau II) e anaplásicos (grau III), e o mesmo partia de uma amostra reduzida (31 doentes).

Vários estudos afirmam que os ependimomas anaplásicos tendem a possuir um IP mais elevado do que os clássicos [34,35,36,37,38]. No entanto, a maioria deles utilizou, mais uma vez, amostras em número muito reduzido, levantando dúvidas sobre a significância estatística dos resultados obtidos [34,35,37,38].

Deve também ser considerado que, mesmo após a revisão recente da classificação de tumores do SNC da OMS, a diferenciação entre ependimomas clássicos e anaplásicos permanece deveras subjectiva, não existindo um consenso sobre as características

histológicas que fazem essa distinção [23]. Um elevado rácio núcleo/citoplasma e uma alta taxa mitótica levantam a suspeita de um ependimoma anaplásico, mas, infelizmente, são critérios subjectivos e/ou ainda pouco especificados. A necrose em pseudo-paliçada e a proliferação endotelial da microvasculatura tumoral constituem também fortes indícios de anaplasia para todos os tipos de gliomas, excepto para os ependimomas anaplásicos, dado que podem existir também focalmente nos clássicos [23,25].

Daqui se deduz a necessidade de estabelecer um critério objectivo que garanta a distinção entre os dois graus de anaplasia dos ependimomas. Na opinião da autora do presente trabalho, tal critério objectivo passa pelo estabelecimento de um valor de corte baseado no cálculo do IP em ependimomas clássicos e anaplásicos. O número de estudos existentes nesse sentido e que possuem amostras significativas é, até ao presente, escasso [39]. É também de sublinhar a inexistência de qualquer estudo desse tipo que incida sobre a população portuguesa. Acrescente-se que a fixação do mencionado valor de corte entre ependimomas clássicos e anaplásicos poderá contribuir para um melhor diagnóstico histológico e tratamento deste tipo de neoplasias e, ainda, para alcançar conclusões mais fiáveis sobre o prognóstico das mesmas. Por último, a análise acessória de uma possível relação entre o IP, por um lado, e, por outro, variáveis como o diagnóstico histológico (ou grau de anaplasia), a localização tumoral, a idade e o sexo do doente, permitirá também incrementar o conhecimento sobre esta forma rara de neoplasia, sobretudo no que respeita às suas características específicas de incidência em Portugal.

## 2. OBJECTIVOS

A diferenciação entre ependimomas clássicos (grau II OMS) e anaplásicos (grau III OMS) assenta, na sua maior parte, em critérios histológicos subjectivos, não havendo um que, reconhecidamente, auxilie na distinção histológica entre os mesmos.

Em consequência, existe a necessidade de encontrar um critério objectivo, de preferência quantitativo, que desempenhe essa função. O estabelecimento de um valor de corte baseado no cálculo do IP de ependimomas classificados como clássicos e anaplásicos constitui uma boa opção para fixar o mencionado critério.

Através do presente estudo, propõe-se:

- Objectivo principal
  - Realizar o cálculo do IP em ependimomas classificados como clássicos e anaplásicos, através de métodos imunohistoquímicos e utilizando o anticorpo Ki-67;
  - Estabelecer um valor de corte do IP entre ependimomas clássicos e anaplásicos.
- Objectivo secundário
  - Estabelecer uma eventual relação entre o IP e variáveis como o diagnóstico histológico (ou grau de anaplasia), a localização do tumor, a idade e o sexo do doente.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo baseado numa amostra de tumores operados no Serviço de Neurocirurgia do Hospital de Santa Maria (Centro Hospitalar de Lisboa Norte) (HSM-CHLN) entre 1990 e 2016 e diagnosticados como ependimomas no Laboratório de Neuropatologia (LN) do mesmo hospital.

Os ependimomas seleccionados correspondem aos graus II e III, segundo a Classificação de Tumores do SNC da OMS de 2007. As diferenças entre os dois tipos de ependimoma foram anteriormente enumeradas (pág.18).

As amostras de tecido originário das cirurgias dos ependimomas encontravam-se previamente coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE) e, quando julgado necessário para o diagnóstico, a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos apropriados tinha sido aplicada.

Os diagnósticos de todas as amostras foram objecto de revisão pelo orientador desta tese. Foram excluídos do estudo 27 casos por uma ou mais das seguintes causas: amostra tecidual muito reduzida, má preservação do tecido, ou dúvida de diagnóstico. Nos casos de recidiva, foi apenas considerado o resultado da primeira cirurgia.

As variáveis clínicas dos doentes (idade, sexo, localização do tumor e diagnóstico histológico/grau de anaplasia) foram recolhidas através da consulta dos processos correspondentes, disponíveis no arquivo do LN. Apenas os números dos processos - e não os respectivos nomes - foram utilizados, a fim de assegurar o direito à confidencialidade dos doentes.

Para o cálculo do IP de cada amostra, procedeu-se, em primeiro lugar, à marcação imunohistoquímica das amostras teciduais (colocadas em lâminas *superfrost® plus* adesivadas) com o anticorpo Ki-67 (MIB-1) na diluição de 1:100. Considerou-se como marcação positiva sempre que as células ficavam coradas de castanho pela acção da peroxidase sobre o cromogénio 3,3'-Diaminobenzidina (DAB).

O protocolo de imunohistoquímica foi efectuado como se segue [40]:

1. Desparafinização dos cortes histológicos em xilol durante 10 minutos
2. Rehidratação dos cortes com passagens em álcool etílico com graduação decrescente (100% - 95% - 70%)
3. Incubação na solução de bloqueio da peroxidase endógena (mistura de 200mL de água destilada com 6mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% p/v) durante 15 minutos
4. 3 lavagens em água corrente durante 5 minutos
5. Recuperação antigénica através da técnica de micro-ondas (850W durante 30 minutos com imersão em tampão citrato comercial a pH6 (1600mL de água destilada em 15mL de solução de recuperação antigénica))
6. Lavagem com tampão fosfato alcalino (PBS) durante 5 minutos
7. Preparação do anticorpo primário com uma diluição de 1:100 (anticorpo MIB-1 diluído em albumina sérica bovina (BSA) 1%), colocação de 150µl em cada corte e incubação do anticorpo durante 60 minutos a 23°C
8. 2 lavagens com PBS durante 5 minutos
9. Incubação com o anticorpo secundário durante 1 hora a 23°C
10. 2 lavagens com PBS durante 5 minutos
11. Revelação com cromogénio DAB, em diluição de 1:50, durante 3 minutos
12. 2 lavagens com PBS durante 5 minutos
13. Lavagem em água destilada durante 5 minutos
14. Coloração com HE durante 4 segundos
15. 3 lavagens com água corrente
16. Lavagem em água amoniacal
17. Desidratação dos cortes com passagens em álcool etílico com graduação crescente (70 – 90% - 100%)
18. Passagem por xilol
19. Montagem em resina sintética (*Entellan*®).

As lâminas foram depois observadas ao microscópio Leica DM4000 B LED, focando-se com a objectiva de 40x. Foram tiradas 10 fotografias de cada caso com a câmara fotográfica Leica incorporada no mesmo microscópio, usando o programa *Leica Application Suite* (versão 4.5.0). As fotografias correspondiam a 10 campos escolhidos ao acaso, evitando-se a sobreposição dos mesmos.

A percentagem de células coradas com Ki-67 em cada caso foi obtida automaticamente através do programa *ImageJ - Image Processing and Analysis in Java* (versão 1.48). As percentagens foram depois registadas com auxílio do programa *Microsoft Access* (*Microsoft® Office Professional Plus 2010*). Por razões de uniformização, todas as contagens e registos foram efectuados pela autora do presente trabalho.

A análise estatística foi realizada através do programa *IBM® SPSS® Statistics* (versão 21).

Para a fixação de um valor de corte do IP entre ependimomas clássicos e anaplásicos, recorreu-se à construção de duas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*), uma para cada grau de anaplasia.

Foi executado o teste estatístico de Levene para avaliar a homogeneidade das distribuições em análise, sendo que estas foram classificadas como não normais. Em consequência, foram seleccionados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para a análise da relação entre o IP e as restantes variáveis (diagnóstico histológico/grau de anaplasia, idade, sexo e localização tumoral).

#### 4. RESULTADOS

No presente estudo foram incluídos 74 doentes, 38 (51,35%) do sexo feminino e 36 (48,65%) do sexo masculino, sendo o rácio 1,06:1. Dos 48 doentes diagnosticados com ependimoma clássico (64,86%), 21 (43,75%) eram do sexo feminino e 27 (56,25%) do masculino [Gráfico 1]. Por sua vez, dos 26 doentes diagnosticados com ependimoma anaplásico (35,14%), 17 (65,38%) eram do sexo feminino e 9 (34,62%) do masculino [Gráfico 1].

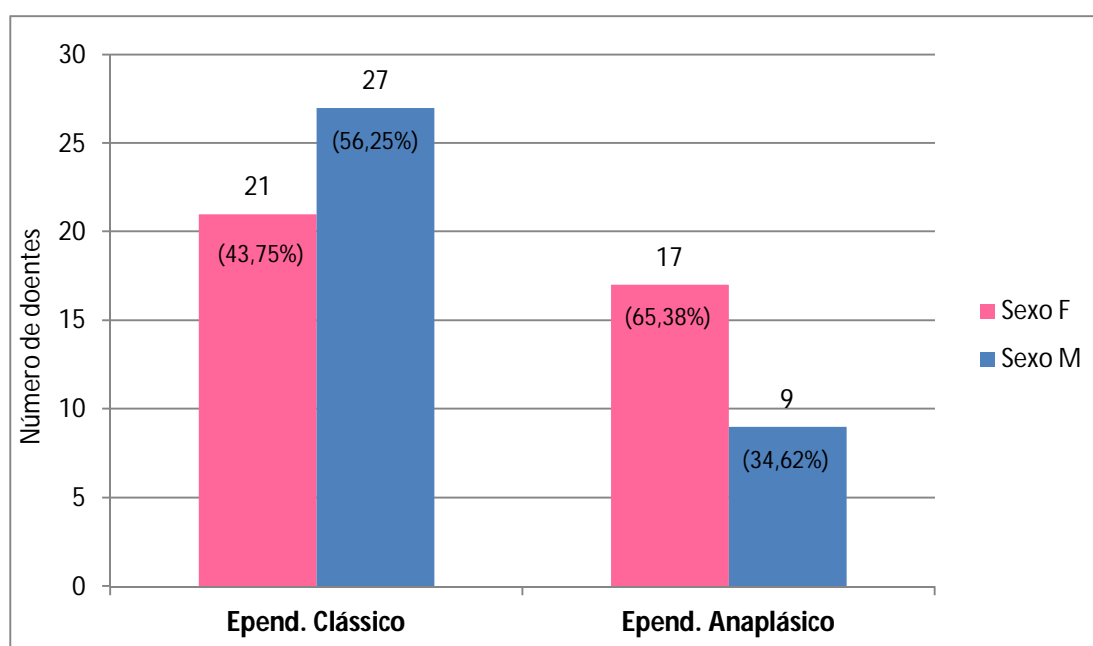


Gráfico 1 – Distribuição dos doentes por sexo e diagnóstico histológico.

A **localização tumoral** foi supra-tentorial em 18 casos (24,32%), infra-tentorial em 33 (44,59%) e espinhal em 23 (31,08%). Dos 18 casos de ependimomas supra-tentoriais, 11 (61,11%) verificaram-se no sexo feminino e 7 (38,89%) no masculino [Gráfico 2]. Dos 33 casos de ependimomas infra-tentoriais, contaram-se 17 (51,52%) correspondentes ao sexo feminino e 16 (48,48%) ao sexo masculino [Gráfico 2]. Por sua vez, dos 23 casos de ependimomas espinhais observados, 10 (43,48%) correspondiam a doentes do sexo feminino e 13 (56,52%) a doentes do sexo masculino [Gráfico 2].

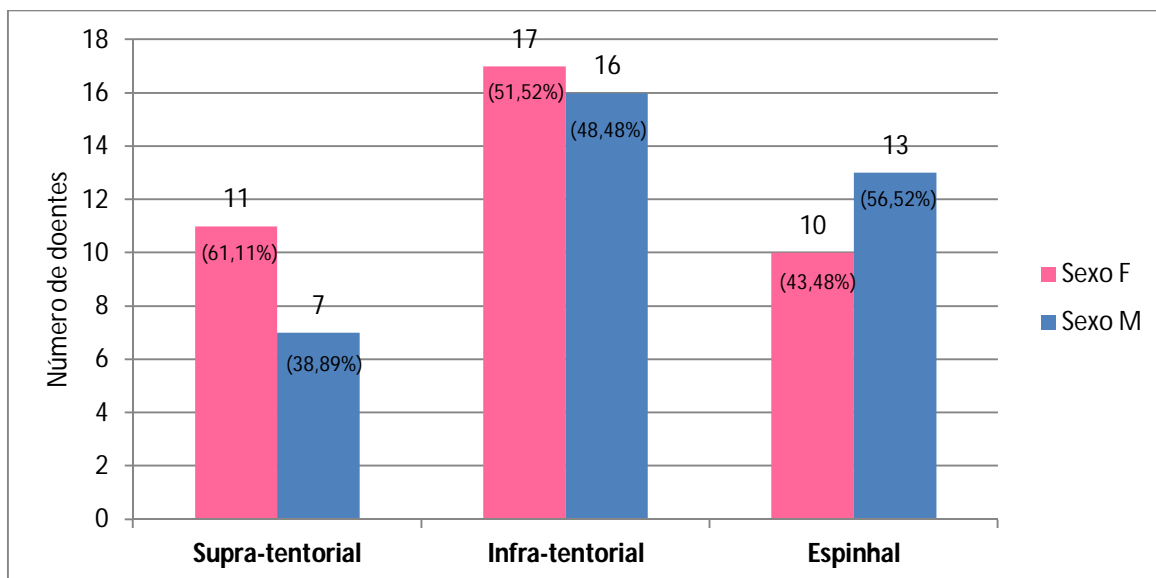


Gráfico 2 – Distribuição dos doentes por sexo e localização tumoral.

A **idade** dos doentes variou entre 1 mês e 72 anos, sendo a média 29,40, a mediana 31,00 e o desvio-padrão 20,96. A média e a mediana de idades consoante o sexo foram, respectivamente, 27,67 e 30,50 para o sexo feminino, e 31,22 e 31,00 para o masculino.

Dos doentes considerados, 26 (35,14%) pertenciam à faixa etária pediátrica (<18anos), sendo os restantes 48 (64,86%) adultos. Verificou-se que a maioria dos doentes se inseria num de dois intervalos de idades: 0-8 anos e 30-50 anos.

No respeitante aos ependimomas clássicos, a média e mediana de idades registadas foram 34,59 e 35,50. Já no que toca aos anaplásicos, as mesmas foram 19,81 e 8,00, respectivamente. O Gráfico 3 ilustra a distribuição dos doentes por idades, consoante o diagnóstico histológico:

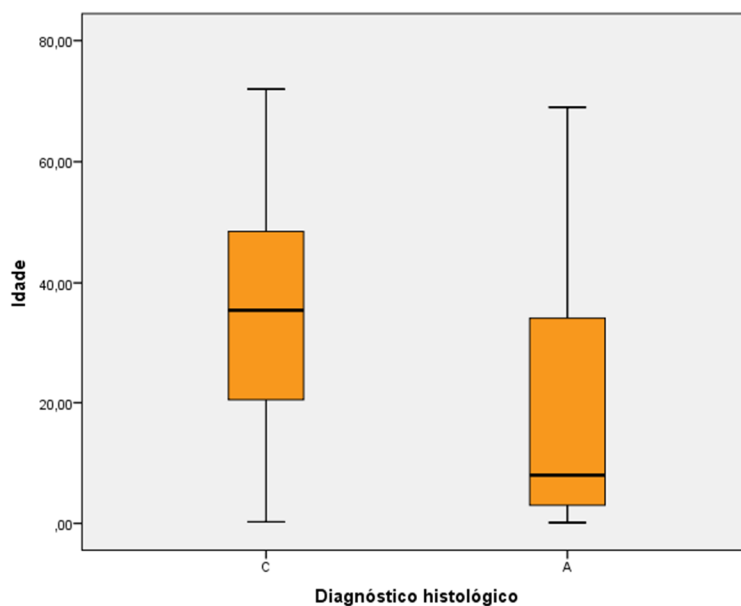


Gráfico 3 – Diagrama de caixa representando a distribuição dos doentes por idades, consoante o diagnóstico histológico (C- ependimoma clássico; A- ependimoma anaplásico).

A média e mediana de idades obtidas em cada uma das localizações foram as seguintes: 23,35 e 13,50 nos ependimomas supra-tentoriais, 24,82 e 23,00 nos infra-tentoriais, e 40,70 e 42,00 nos espinhais. No Gráfico 4 encontra-se representada a distribuição dos doentes por idades, segundo a localização tumoral:

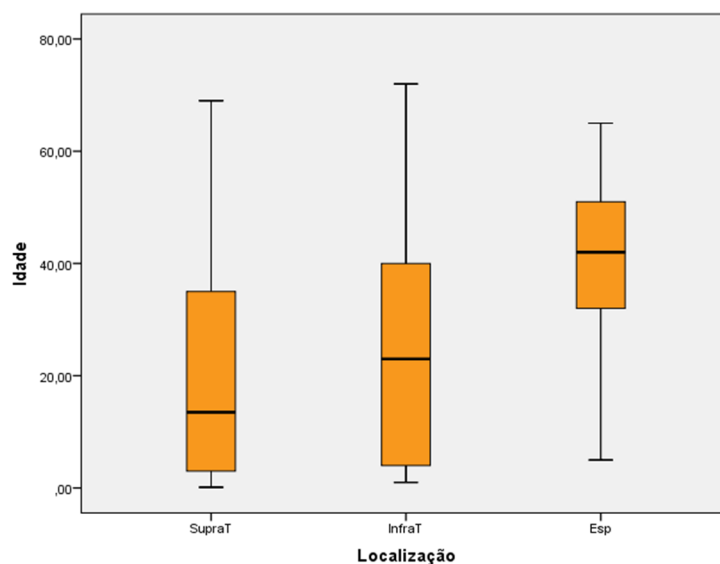


Gráfico 4 - Diagrama de caixa representando a distribuição dos doentes por idades, consoante a localização tumoral (SupraT – supra-tentorial, InfraT – infra-tentorial, Esp – espinhal).

Relativamente ao **IP** dos ependimomas em estudo, os valores variaram entre 0,00 e 57,40, sendo a média dos valores calculados 4,14, a mediana 0,80 e o desvio-padrão 8,14. Os valores do IP da totalidade dos casos considerados encontram-se listados no Anexo B (pág.52).

Foram também calculadas a média e mediana do IP por diagnóstico histológico, sexo, idade e localização tumoral [Tabela 2]. As distribuições dos valores de IP consoante o diagnóstico histológico, a faixa etária e a localização tumoral encontram-se representadas nos Gráficos 5, 6 e 7, respectivamente.

	<b>Média (Ki-67(%))</b>	<b>Mediana (Ki-67(%))</b>
<b>Epend. Clássico</b>	0,62	0,50
<b>Epend. Anaplásico</b>	10,63	8,15
<b>Sexo F</b>	5,69	1,45
<b>Sexo M</b>	2,49	0,75
<b>Idade &lt;18 anos</b>	7,48	4,40
<b>Idade ≥18 anos</b>	2,32	0,60
<b>Supra-tentorial</b>	4,69	2,10
<b>Infra-tentorial</b>	6,27	1,50
<b>Espinhal</b>	0,64	0,60

Tabela 2 – Média e mediana dos IP por diagnóstico histológico, sexo, idade e localização tumoral.

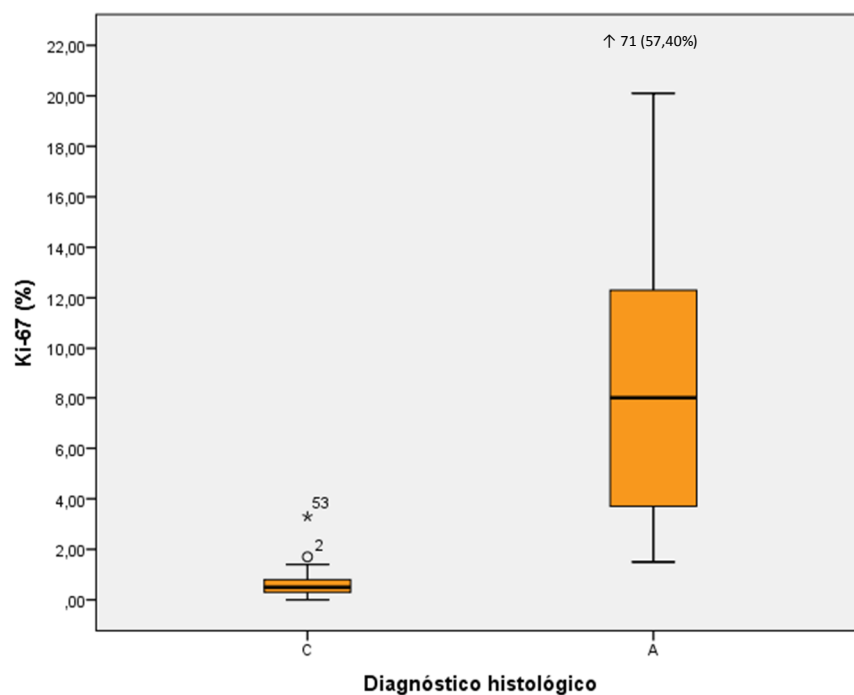


Gráfico 5 – Diagrama de caixa representando a distribuição dos diferentes valores do IP, separados por diagnóstico histológico (C- ependimoma clássico; A- ependimoma anaplásico).

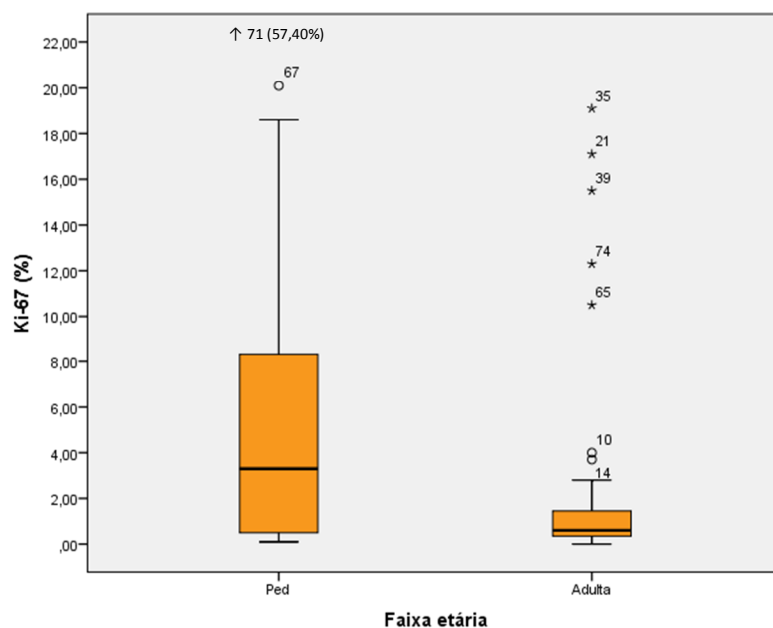


Gráfico 6 - Diagrama de caixa representando a distribuição dos diferentes valores do IP, separados por faixa etária (pediátrica: <18 anos; adulta: ≥18 anos).



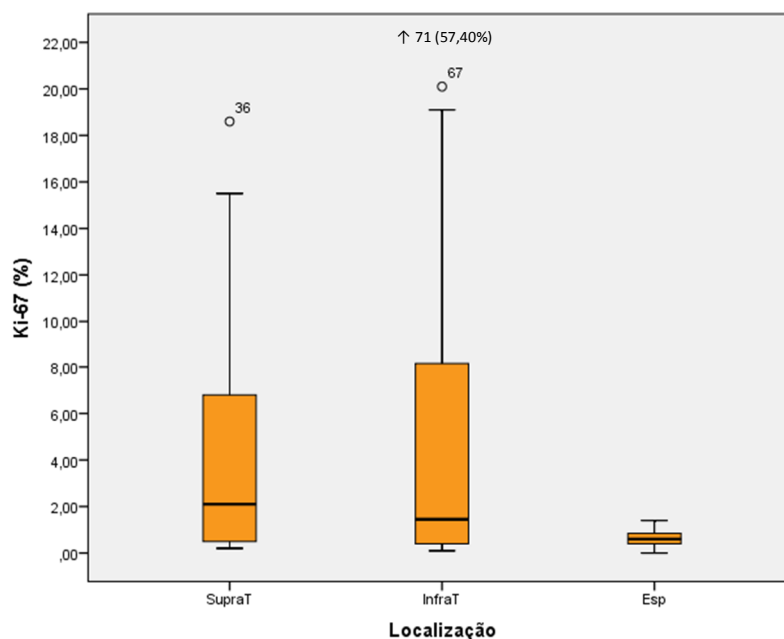


Gráfico 7 - Diagrama de caixa representando a distribuição dos diferentes valores do IP separados por localização (SupraT - supra-tentorial; InfraT - infra-tentorial; Esp - espinhal).

Foram elaboradas duas curvas ROC, referentes aos ependimomas clássicos e anaplásicos, para estabelecimento de um ponto de corte entre os IP dos mesmos. A partir da curva ROC respeitante aos ependimomas anaplásicos, e na tentativa de obtenção de um ponto de corte que maximizasse tanto a sensibilidade como a especificidade, concluiu-se que o ponto de corte óptimo para o IP foi de 1,45%, com sensibilidade de 100% e especificidade de 95,8% [Gráfico 8].

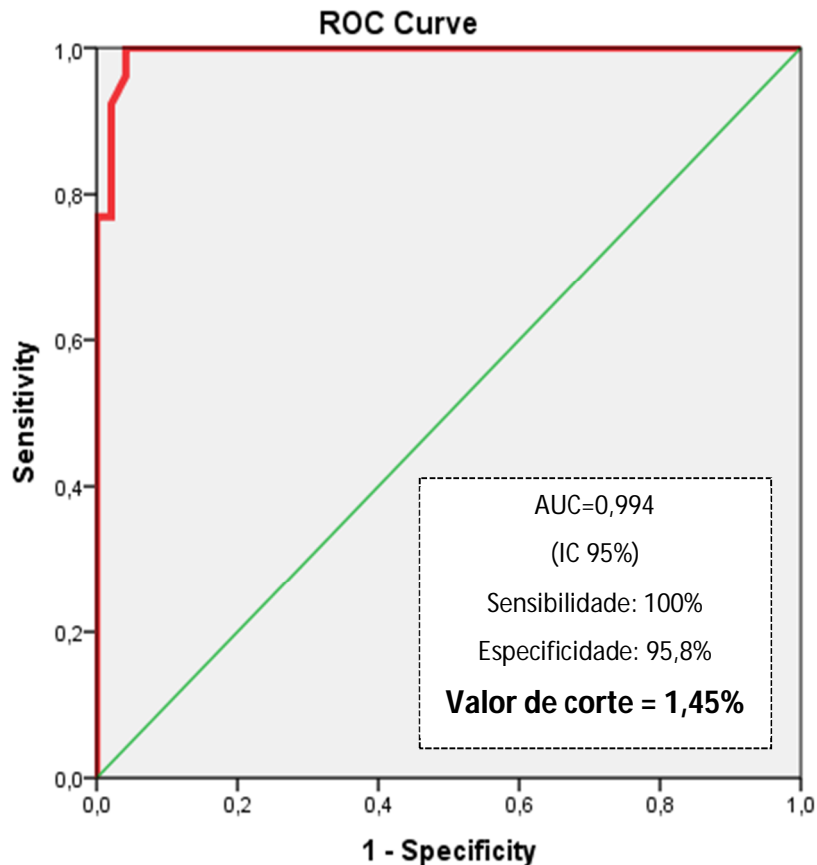


Gráfico 8 – Curva ROC relativa ao IP dos ependimomas anaplásicos.

Seguidamente foi efectuado o **teste de Levene** com o objectivo de avaliar a homogeneidade da amostra relativa ao IP em função das outras variáveis. Para o efeito, foram utilizadas as variáveis “diagnóstico histológico” e “sexo”. Os valores  $p$  obtidos em cada caso encontram-se detalhados na Tabela 3:

Variáveis	Valor $p$
Ki-67(%) em função do diagnóstico histológico	<0,001
Ki-67(%) em função do sexo	0,019

Tabela 3 – Resultados do teste de Levene.

A homogeneidade da amostra da variável “IP” em relação ao diagnóstico histológico e ao sexo não ficou provada com o teste de Levene ( $p < 0,05$ ). Logo, a hipótese nula foi rejeitada, concluindo-se que as variâncias eram significativamente diferentes e que a

distribuição em análise era não normal. Por esse motivo, foram utilizados **testes não paramétricos** para comparar a variável “IP” com as variáveis “diagnóstico histológico”, “sexo”, “idade” e “localização tumoral” [Tabela 4]. As variáveis “idade” e “localização” foram ainda divididas, respectivamente, em duas faixas etárias principais (<18 anos e ≥18 anos) e nas diferentes localizações (supra-tentorial, infra-tentorial e espinhal) [Tabela 4]. Para assegurar uma maior sensibilidade aos testes efectuados, todas as variáveis foram testadas com e sem a presença de *outliers*.

Comparação entre variáveis	Teste utilizado	Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> (sem <i>outliers</i> )
<b>Ki-67(%) – diagn. histológico</b>	Mann-Whitney	<0,001	<0,001
<b>Ki-67(%) – sexo</b>	Mann-Whitney	0,360	0,531
<b>Ki-67(%) – idade</b>	Kruskal-Wallis	0,366	0,369
<b>Ki-67(%) – faixa etária</b>	Mann-Whitney	0,008	0,020
<b>Ki-67(%) – localização</b>	Kruskal-Wallis	0,040	0,062
<b>Ki-67(%) – SupraT</b>	Kruskal-Wallis	0,063	0,058
<b>Ki-67(%) – InfraT</b>	Kruskal-Wallis	0,006	0,005
<b>Ki-67(%) - Esp</b>	Kruskal-Wallis	0,001	0,001

Tabela 4 – Comparações entre variáveis, testes estatísticos utilizados e valores de significância obtidos.

A comparação, através do teste de Mann-Whitney, entre os IP consoante o diagnóstico histológico indicou que a hipótese nula devia ser rejeitada ( $p<0,05$ ) e que a diferença entre os IP dos ependimomas clássicos e os dos anaplásicos era estatisticamente significativa [Tabela 4 e Gráfico 9].

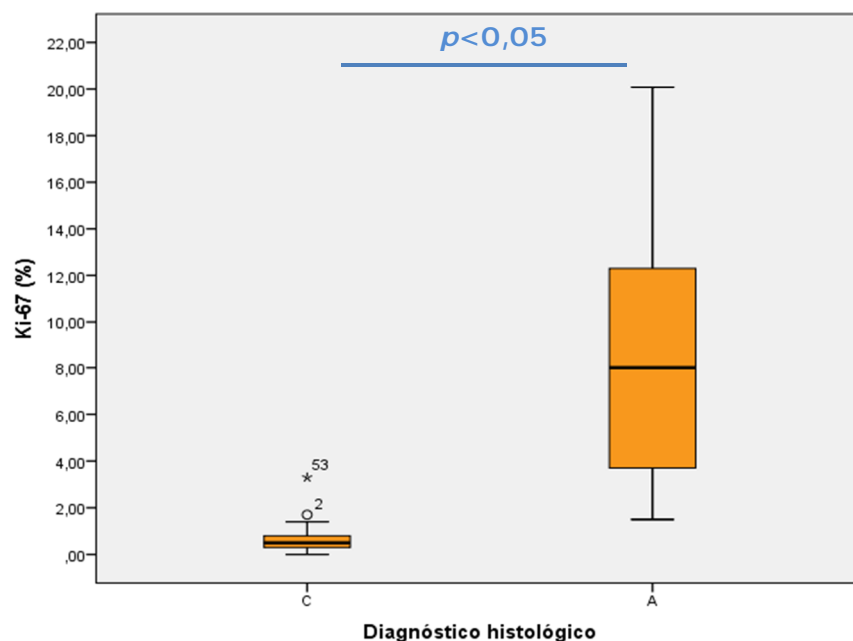


Gráfico 9 - Diagrama de caixa representando o valor  $p$  e a distribuição dos diferentes valores do IP separados por diagnóstico histológico (C- ependimoma clássico; A- ependimoma anaplásico).

O mesmo não se verificou na comparação entre os IP consoante o sexo ( $p > 0.05$ ); a variável “sexo” não estava, consequentemente, associada a diferenças estatisticamente significativas no IP [Tabela 4 e Gráfico 10].

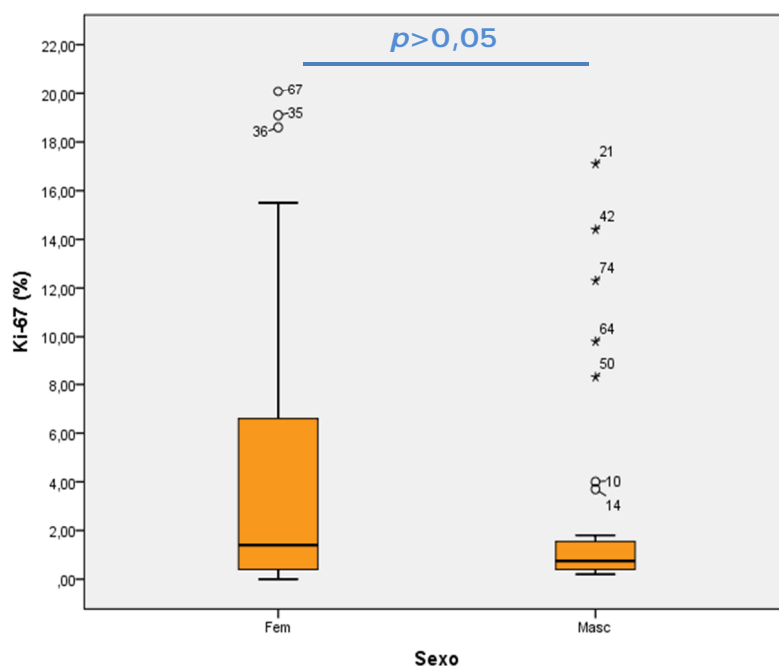


Gráfico 10 - Diagrama de caixa representando o valor  $p$  e a distribuição dos diferentes valores do IP separados por sexo.

O mesmo tipo de resultado foi obtido quando foram testados o IP e a idade, recorrendo ao teste de Kruskal-Wallis. Contudo, quando a variável “idade” foi subdividida em dois grupos principais – a faixa pediátrica e a faixa adulta -, verificou-se existir uma diferença estatisticamente significativa no que toca ao IP, consoante se tratasse de um doente adulto ou menor de 18 anos [Tabela 4 e Gráfico 11].

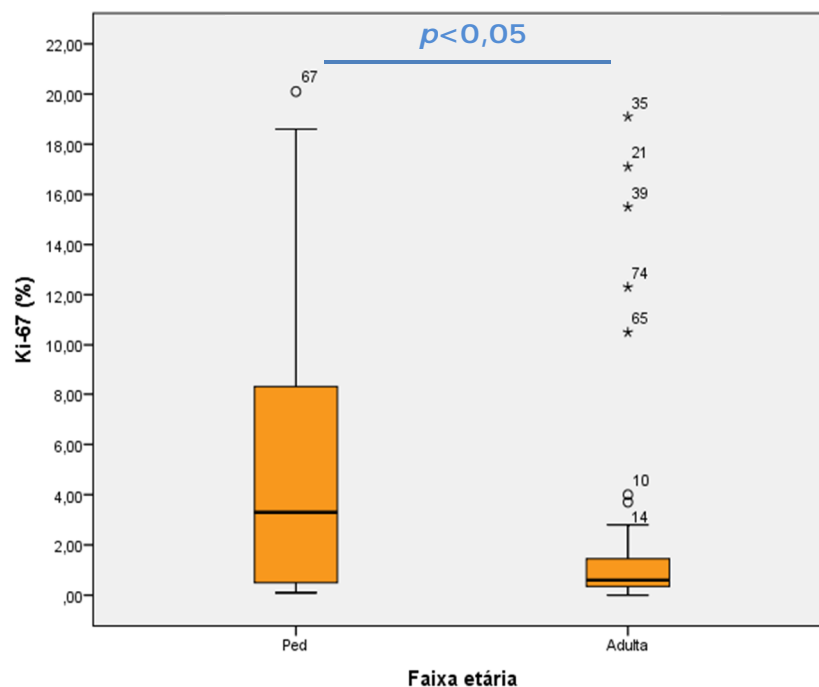


Gráfico 11 - Diagrama de caixa representando o valor  $p$  e a distribuição dos diferentes valores do IP separados por faixa etária (pediátrica: <18 anos; adulta:  $\geq 18$  anos).

Quanto à localização tumoral, o valor  $p$  gerado pelo teste de Kruskal-Wallis apresentou-se abaixo de 0,05 no caso de manutenção dos *outliers*, mas acima de 0,05 quando os *outliers* foram retirados do cálculo [Tabela 4]. Foi, seguidamente, testado o IP em relação a cada um dos três tipos de localização tumoral, de forma a alcançar uma definição mais minuciosa dos resultados obtidos. A localização supra-tentorial não estava associada a diferenças significativas a nível estatístico no que respeita ao IP ( $p > 0,05$ ) [Tabela 4 e Gráfico 12]. Pelo contrário, o IP revelou diferenças estatisticamente significativas no que toca aos ependimomas infra-tentoriais e também aos espinhais ( $p < 0,05$ ) [Tabela 4 e Gráfico 12].

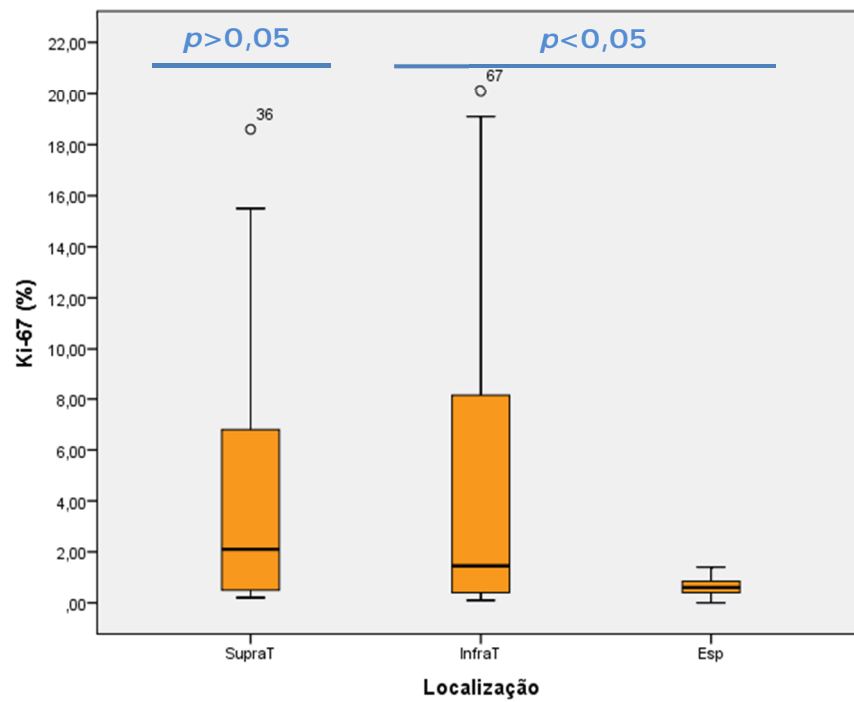


Gráfico 12 - Diagrama de caixa representando o valor  $p$  e a distribuição dos diferentes valores do IP separados por localização (SupraT - supra-tentorial; InfraT - infra-tentorial; Esp - espinal).

## 5. DISCUSSÃO

A distinção entre ependimomas clássicos e anaplásicos é, actualmente, deveras subjectiva, não existindo um critério universalmente reconhecido para a sua diferenciação histológica inequívoca [23]. Consequentemente, o presente estudo propôs, como objectivo primário, a fixação de um valor de corte com base no cálculo do IP dos dois tipos de ependimomas. Foi estabelecido o valor de 1,45%, com um intervalo de confiança de 95% e uma sensibilidade e especificidade bastante satisfatórias (100% e 95,8%, respectivamente). Este valor de corte é significativamente mais baixo do que o apresentado por Wolfsberger *et al.* (2004) num estudo que incidiu sobre uma amostra de 103 ependimomas, sendo o *cut-off* neste caso de 20,5% [39]. Tal diferença pode dever-se a vários factores, como os distintos tamanhos das amostras, a variabilidade entre os protocolos laboratoriais para execução de certas técnicas (histologia convencional, imunohistoquímica, cálculo do IP), o diagnóstico realizado por diferentes observadores, e ainda o facto de o estudo mencionado se centrar apenas em ependimomas intracranianos, excluindo os espinhais.

O objectivo secundário deste estudo foi o estabelecimento de uma eventual relação entre, por um lado, o IP e, por outro, o diagnóstico histológico (ou grau de anaplasia), a idade, o sexo e a localização tumoral.

O IP abrangeu percentagens similares às verificadas em investigações anteriores [39], ficando a sua média e mediana também entre os valores obtidos nas mesmas.

No presente estudo, a média e mediana dos IP dos ependimomas clássicos foram notoriamente mais elevadas do que as correspondentes aos ependimomas anaplásicos. Ficou também estatisticamente provado que tal diferença entre os IP é relevante, havendo uma definitiva correspondência entre um menor ou maior grau de anaplasia diagnosticado e um IP mais reduzido ou mais elevado, respectivamente. Isto denota a importância primordial que o IP tem na classificação do grau de anaplasia dos ependimomas.

Quanto à relação entre o IP e o sexo, a média dos IP do sexo feminino foi maior do que no sexo masculino. Todavia, comparando as medianas, a diferença não foi notória. Não

se verificou também uma associação importante em termos estatísticos entre as variáveis “sexo” e “IP”.

Numa fase inicial, não parecia existir uma associação estatística convincente entre a idade e o IP. Tal pode dever-se ao facto de as idades, variáveis contínuas com uma extensão considerável, terem sido testadas estatisticamente como um todo. Contudo, a distinção entre as médias e medianas dos IP nas duas divisões etárias consideradas ( $<18$  anos e  $\geq 18$  anos) foi bastante marcada, com valores mais elevados na faixa pediátrica do que nos doentes adultos. Quando os dois grupos etários foram testados estatisticamente com o IP, verificou-se a existência de diferenças muito significativas entre os IP de ambos. Conclui-se, então, que os ependimomas com IP mais elevados tendem a manifestar-se nos doentes mais novos.

No respeitante às localizações, os IP observados tenderam para valores mais reduzidos nos ependimomas espinhais do que nos supra-tentoriais e infra-tentoriais. A princípio, parecia dúbio que a localização tumoral estivesse associada a diferenças estatisticamente significativas no IP, dado que o valor  $p$  foi menor que 0,05 apenas quando foram retirados os *outliers*. Esta ambiguidade pode ser explicada pelo facto de, nesta primeira fase, a variável “localização” ter sido testada de forma global, em vez de cada uma das localizações ter sido separadamente testada. Deve ser também acrescentado que existe um *outlier* (57,40%) no IP que se distancia bastante dos outros valores, sendo que o mesmo pode ter contribuído para a disparidade entre os valores  $p$  obtidos. Todavia, quando se testou o IP em relação a cada uma das localizações em separado, concluiu-se que os ependimomas infra-tentoriais e os espinhais revelavam diferenças nos IP que eram demasiado grandes para se deverem ao acaso. Pode ser, então, inferida a tendência que os ependimomas infra-tentoriais revelam para IP mais elevados, e a tendência oposta dos ependimomas espinhais. Pelo contrário, os testes efectuados não permitiram alcançar uma conclusão definitiva sobre os ependimomas supra-tentoriais. É possível que tal se deva à existência de um número mais reduzido de casos de ependimomas com esta localização na amostra analisada, em comparação com os números obtidos para os ependimomas das outras localizações.



## 6. CONCLUSÃO

Devido à subjectividade dos critérios da OMS para a distinção histológica entre ependimomas clássicos e anaplásicos, foi proposto neste estudo o estabelecimento de um ponto de corte entre os dois tipos de ependimomas, baseado no cálculo do IP. Esse valor foi de 1,45%, com garantia de sensibilidade e especificidade elevadas.

Foi também analisada a associação entre o IP e variáveis como o diagnóstico histológico (ou grau de anaplasia), o sexo, a idade e a localização tumoral. Houve uma correspondência estatística entre o IP e o diagnóstico histológico, e também entre o IP e a faixa etária ( $<18$  anos ou  $\geq 18$  anos). Pelo contrário, não se verificou uma associação estatisticamente relevante entre o IP e o sexo. Quanto à localização tumoral, os ependimomas infra-tentoriais e espinhais apresentaram uma correspondência estatística em relação ao IP, em oposição aos ependimomas supra-tentoriais. Concluiu-se a presença de uma associação entre IP mais elevados e maior anaplasia, menor idade e localização infra-tentorial, e também entre IP mais reduzidos e localização espinal.

O presente estudo constitui uma tentativa de desenvolver o conhecimento existente sobre uma forma rara de neoplasia, procurando contribuir para uma melhoria do seu diagnóstico histológico e tratamento. É de reiterar também a inexistência de qualquer estudo do género que incida sobre a população portuguesa.

Há que mencionar, contudo, algumas limitações no estudo. Em primeiro lugar, deve ser apontada a sua amostra reduzida - esta foi, contudo, a amostra possível, especialmente tendo em conta a raridade da patologia escolhida. Registaram-se também alguns desequilíbrios em certas variáveis. Houve, por exemplo, um número muito superior de doentes maiores de 18 anos em relação aos pediátricos - o que é explicável pelo largo espectro de idades presentes no estudo. Verificou-se também um número reduzido de casos de ependimomas anaplásicos, em comparação com os de ependimomas clássicos - tal não é surpreendente se se tiver em conta que a faixa pediátrica, na qual se verifica uma maior incidência de ependimomas anaplásicos, se encontra aqui sub-representada. A presença de um *outlier* (57,40%) de valor significativo entre os IP dos ependimomas previamente diagnosticados como anaplásicos também poderia ser algo a apontar - no

entanto, tal limitação foi afastada, pois os testes estatísticos foram executados com inclusão de *outliers* e também com a sua exclusão.

Conclui-se que serão necessários estudos adicionais, com amostras de maior dimensão, não só para validar os resultados obtidos e o conhecimento até agora adquirido, mas também para expandir esse conhecimento em novas direcções, nomeadamente no sentido de correlacionar o IP destes tumores com os respectivos estudos citogenéticos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, por toda a disponibilidade e apoio;

Ao Pedro Pereira e à Carla Firmo, pela preciosa ajuda;

Ao B. e ao T., pela amizade;

Aos meus pais e irmã, por tudo.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Young, B. et al. Nervous Tissues. In: Young, B. et al. Weather's Functional Histology – A Text and Colour Atlas. 5<sup>th</sup> Ed. UK: Churchill Livingstone/Elsevier; 2006; 7:122-150.
- [2] Snell, Richard S. Introduction and Organization of the Nervous System. In: Snell, Richard S. Clinical Neuroanatomy. 7<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2010; 1:1-27.
- [3] Snell, Richard S. The Development of the Nervous System. In: Snell, Richard S. Clinical Neuroanatomy. 7<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2010; 18:501-515.
- [4] Bruni, J.E. (1998). Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech* 41, 2–13.
- [5] Morest, D.K., and Silver, J. (2003). Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* 43, 6–18.
- [6] Spassky, N., Merkle, F.T., Flames, N., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25, 10–18.
- [7] Jiménez, A.J., Domínguez-Pinos, M.-D., Guerra, M.M., Fernández-Llebrez, P., and Pérez-Fígares, J.-M. (2014). Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers* 2, e28426.
- [8] Ševc, J., Daxnerová, Z., Haňová, V., and Koval', J. (2011). Novel observations on the origin of ependymal cells in the ventricular zone of the rat spinal cord. *Acta Histochemica* 113, 156–162.

- [9] Sadler, T.W. (2005). Embryology of neural tube development. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135C, 2–8.
- [10] Alberts, B. et al. The Cell Division Cycle. In: Alberts, B. et al. *Essential Cell Biology*. 3rd Ed. New York: Garland Science; 2010; 18:609-648.
- [11] Herrup, K. (2013). Post-mitotic role of the cell cycle machinery. *Curr Opin Cell Biol* 25, 711–716.
- [12] Hardwick, L.J.A., Ali, F.R., Azzarelli, R., and Philpott, A. (2015). Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 359, 187–200.
- [13] Imoto, Y., Yoshida, Y., Yagisawa, F., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. (2011). The cell cycle, including the mitotic cycle and organelle division cycles, as revealed by cytological observations. *J Electron Microsc (Tokyo)* 60 Suppl 1, S117-136.
- [14] Williams, G.H., and Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *J Pathol* 226, 352–364.
- [15] Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131–149.
- [16] Rhind, N., and Russell, P. (2012). Signaling pathways that regulate cell division. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- [17] Hirano, T. (2015). Chromosome Dynamics during Mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- [18] Diaz-Moralli, S., Tarrado-Castellarnau, M., Miranda, A., and Cascante, M. (2013). Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 138, 255–271.

- [19] Alberts, B. et al. Cellular Communities: Tissues, Stem Cells, and Cancer. In: Alberts, B. et al. Essential Cell Biology. 3rd Ed. New York: Garland Science; 2010; 20:689-730.
- [20] Lenting, K., Verhaak, R., Ter Laan, M., Wesseling, P., and Leenders, W. (2017). Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133, 263–282.
- [21] Schneider, T., Mawrin, C., Scherlach, C., Skalej, M., and Firsching, R. (2010). Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int* 107, 799–807; quiz 808.
- [22] Ganau, L., Paris, M., Ligarotti, G.K., and Ganau, M. (2015). Management of Gliomas: Overview of the Latest Technological Advancements and Related Behavioral Drawbacks. *Behav Neurol* 2015, 862634.
- [23] Perry, A., and Wesseling, P. (2016). Histologic classification of gliomas. *Handb Clin Neurol* 134, 71–95.
- [24] Takei, H., Bhattacharjee, M.B., Rivera, A., Dancer, Y., and Powell, S.Z. (2007). New immunohistochemical markers in the evaluation of central nervous system tumors: a review of 7 selected adult and pediatric brain tumors. *Arch Pathol Lab Med* 131, 234–241
- [25] Ellison, D.W. et al. Ependymal Tumours. In: Louis, David N. et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4<sup>th</sup> Ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016; 3:102-114.
- [26] Reni, M., Gatta, G., Mazza, E., and Vecht, C. (2007). Ependymoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 63, 81–89.
- [27] Dorfer, C., Tonn, J., and Rutka, J.T. (2016). Ependymoma: a heterogeneous tumor of uncertain origin and limited therapeutic options. *Handb Clin Neurol* 134, 417–431.

- [28] Armstrong, T.S., Vera-Bolanos, E., Bekele, B.N., Aldape, K., and Gilbert, M.R. (2010). Adult ependymal tumors: prognosis and the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Neuro Oncol* 12, 862–870.
- [29] Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311–322.
- [30] Brown, D.C., and Gatter, K.C. (2002). Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40, 2–11.
- [31] Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A.Z., Muller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A.A., and Gerlich, D.W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* 535, 308–312.
- [32] Schlüter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M.H., Key, G., Flad, H.D., and Gerdes, J. (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123, 513–522.
- [33] Chen, W.-J., He, D.-S., Tang, R.-X., Ren, F.-H., and Chen, G. (2015). Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 16, 411–420.
- [34] Manasa, L.P., Uppin, M.S., and Sundaram, C. (2012). Correlation of p53 and KI-67 expression with grade and subtype of ependymoma. *Indian J Pathol Microbiol* 55, 308–313.
- [35] Schröder, R., Ploner, C., and Ernestus, R.I. (1993). The growth potential of ependymomas with varying grades of malignancy measured by the Ki-67 labelling index and mitotic index. *Neurosurg Rev* 16, 145–150.
- [36] Suri, V.S., Tatke, M., Singh, D., and Sharma, A. (2004). Histological spectrum of ependymomas and correlation of p53 and Ki-67 expression with ependymoma grade and subtype. *Indian J Cancer* 41, 66–71.

- [37] Suzuki, S., Oka, H., Kawano, N., Tanaka, S., Utsuki, S., and Fujii, K. (2001). Prognostic value of Ki-67 (MIB-1) and p53 in ependymomas. *Brain Tumor Pathol* 18, 151–154.
- [38] Zawrocki, A., Izycka-Swieszewska, E., Papierz, W., Liberski, P.P., Zakrzewski, K., and Biernat, W. (2011). Analysis of the prognostic significance of selected morphological and immunohistochemical markers in ependymomas, with literature review. *Folia Neuropathol* 49, 94–102.
- [39] Wolfsberger, S., Fischer, I., Hoftberger, R., Birner, P., Slavc, I., Dieckmann, K., Czech, T., Budka, H., and Hainfellner, J. (2004). Ki-67 immunolabeling index is an accurate predictor of outcome in patients with intracranial ependymoma. *Am J Surg Pathol* 28, 914–920.
- [40] Costa, S., Marques, J., Pereira, P., Firmo, C., and Pimentel, J. (2012). 23-year-old man with a superficial cortical brain tumor. *Brain Pathol* 22, 429–432.



## **ANEXO A - Lista de reagentes**

- Eosina a 1%, Merck®, Lote 1.15935.0100, Ref K22154935
- Hematoxilina pura, Merck®, Lote 1.09249.0500, Ref HX390929
- Lâminas Thermo Scientific, Menzel-Gläser, superfrost® plus, 25x75x1,0 mm
- Monoclonal mouse anti-human Ki-67 antigen clone MIB-1, Dako®, Lote 20023414, Ref M7240
- PBS Dulbecco, Merck Millipore®, Lote 0685D, Ref L182-05
- Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Dako Real® Envision® Detection System, Lote 20039541, Ref K5007:
  - HRP Rabbit/Mouse, 100mL, pronto a usar, 200µl por amostra
  - Substrate buffer, 250mL, conjugado com cromogénio DAB+ (50x), 5mL
- Peróxido de hidrogénio a 3% em água destilada, Merck®, Lote 1.07210.0250, Ref K47934310633
- Solução de recuperação antigénica à base de citrato, Vector®, Lote ZB0212, Ref H-3300

**ANEXO B – Lista dos índices proliferativos dos 74 casos de ependimomas em estudo**

Ki-67 (%)					
1	0,40	29	0,20	58	6,00
2	1,70	30	0,20	59	5,50
3	0,30	31	0,50	60	0,80
4	1,50	32	0,60	61	0,50
5	0,50	33	0,20	62	0,80
6	0,70	34	1,80	63	2,40
7	2,80	35	19,10	64	9,80
8	0,40	36	18,60	65	10,50
9	0,50	37	0,10	66	6,80
10	4,00	38	10,10	67	20,10
11	0,50	39	15,50	68	1,40
12	0,30	40	0,50	69	0,20
13	1,20	41	1,40	70	0,90
14	3,70	42	14,40	71	57,40
15	0,40	43	0,20	72	0,40
16	0,20	44	0,80	73	1,00
17	1,70	45	10,60	74	12,30
18	1,00	46	0,60		
19	0,10	47	1,90		
20	0,50	48	1,20		
21	17,10	49	0,40		
22	0,40	50	8,30		
23	0,40	51	0,70		
24	0,30	52	1,00		
25	0,60	53	3,30		
26	0,20	54	0,60		
27	0,00	55	0,30		
28	0,20	56	8,00		
		57	6,60		

